

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Untersuchungen zur Wirkung von
β-chlorierten Methylhydrazinen
auf Ehrlich-Asciteszellcarcinomzellen in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn**

vorgelegt von

**Rainer Mangold
aus Kassel**

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Untersuchungen zur Wirkung von
β-chlorierten Methylhydrazinen
auf Ehrlich-Asciteszellcarcinomzellen in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Rainer Mangold
aus Kassel

Marburg 1975

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 21.11.1975
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Bernhardt

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	4
B. I. <u>Materialien</u>	4
1. Cytostatisch-wirksame Substanzen	4
2. Radioaktiv markierte Substanzen	4
3. Eagle's Basal Medium	5
4. Reagenzien	5
5. Messung der Aktivität	5
6. PEI-Cellulose	5
B. II. <u>Methoden</u>	6
1. Vorbereitung der Versuchstiere und Gewinnung der Asciteszellen	6
2. Einbauversuche	6
3. Extraktion der löslichen Nukleobausteine	7
4. Extraktion von RNS, DNS und Protein	7
5. Bestimmung von RNS, DNS, Protein und löslichen Nukleo-Bausteinen	8
6. Trennung des kalten Perchlorsäure-Extraktes an einer PEI-Cellulose-Säule	9
a) Versuchsanordnung und Aufarbeitung des kalten HClO ₄ -Extraktes	9
b) Vorbereitung der PEI-Säule	9
c) Versuchsanordnung und zeitlicher Ablauf der Trennung	10
7. Bestimmung der eingebauten Aktivität	10
8. Auswertung der Ergebnisse	11
a) Einbauversuche	11
b) Säulenchromatographische Trennung	12
C. <u>Ergebnisse</u>	13
C. I. <u>Einbauversuche</u>	13
1. Hemmung des Thymidin-Einbaus durch	
a) N-Methyl-N'-8-chloräthylhydrazinhydrochlorid	13
b) N'-Methyl-N'-8-chloräthylbenzaldehydhydrazonhydrochlorid	16
c) N,N-Dimethylhydrazin	18
d) Procarbazin (Natulan(R))	21
2. Hemmung des Uridineinbaus unter Einwirkung der vier Substanzen	
a) N-Methyl-N'-8-chloräthylhydrazinhydrochlorid	24
b) N'-Methyl-N'-8-chloräthylbenzaldehydhydrazonhydrochlorid	27
c) N,N-Dimethylhydrazin	30
d) Procarbazin (Natulan(R))	33

C.I. 3. Die Hemmung des Leucin-Einbaus durch	
a) N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinhydrochlorid	36
b) N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazonhydrochlorid	39
c) N,N-Dimethylhydrazin	42
d) Procarbazin (Natulan(R))	45
4. Vergleichende Zusammenfassung über den Einfluß des N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinhydrochlorid bzw. des N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazonhydrochlorid auf den Einbau von Thymidin, Uridin und Leucin in die Ehrlich-Asciteszellcarcinomzelle	48
5. Die Hemmwirkung des N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinhydrochlorid und des N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazonhydrochlorid auf den Thymidin-, Uridin- und Leucineinbau im Vergleich zum N,N-Dimethylhydrazin und Procarbazin	
a) Thymidinaufnahmehemmung	51
b) Uridinaufnahmehemmung	53
c) Leucinaufnahmehemmung	55
6. Betrachtung des Verhältnisses der eingebauten Aktivität zur aufgenommenen Gesamtaktivität	57
a) Untersuchung der DNS-Synthese	57
b) Untersuchung der RNS-Synthese	59
c) Untersuchung der Protein-Synthese	61
C.II. Die säulenchromatographische Trennung des säurelöslichen HClO ₄ -Extraktes unter dem Einfluß der vier Substanzen	63
1. Verteilung von Thymidin auf Nukleosid-, Mono-, Di- und Triphosphat-Peaks	63
2. Verteilung von Uridin auf Nukleosid-, Mono-, Di- und Triphosphat-Peaks	68
D. <u>Diskussion</u>	73
E. <u>Zusammenfassung</u>	78
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	79

A. E I N L E I T U N G

Hydrazin und seine Derivate besaßen lange Zeit neben technischem nur toxikologisches Interesse. Etwa ab 1950 wurden jedoch Hydrazinabkömmlinge gefunden, die in verschiedenen pharmakologischen Bereichen Bedeutung erlangt haben.

So sind das Isonicotinsäurehydrazid (INH) (1) und seine Hydrazone (2) Tuberculostatica erster Wahl. Bei dem INH-Derivat Iproniazid (3) wurde eine hemmende Wirkung auf die Monaminoxidase festgestellt, was zur Entwicklung zahlreicher MAO-Hemmer (4) führte, die heute allerdings keine größere klinische Bedeutung mehr besitzen.

Die Hydrazine (5) wurden als wertvolle Antihypertonica und Therapeutica bei peripheren Durchblutungsstörungen erkannt. Die Hydrazone und Semincarbazine des 5-Nitrofurals (6) besitzen gute chemotherapeutische Eigenschaften.

In jüngerer Zeit fanden die Hydrazine, in erster Linie die Methylhydrazine, als cytostatisch wirksame Substanzen Beachtung. So berichteten ZELLER (7) und BOLLAG (8) u.a., daß die Methylhydrazine (allgemeine Formel $\text{CH}_3\text{-NH-NH-R}$) tumorhemmende Eigenschaften besitzen. Nach ihren Erkenntnissen ist die cytostatische Wirkung an das Vorhandensein der Methylgruppe gebunden. Nach SCHMID und MÜLLER (9) beeinflussen Hydrazin und seine alkylierten Formen das Wachstum von Bäckerhefe und Ehrlich's Asciteszellen in vitro. Aber auch in vivo konnte eine hemmende Wirkung des Hydrazin und Methylhydrazin auf die Entwicklung des Ehrlich-Asciteszellcarcinom der Maus nachgewiesen werden (10). F. LINGENS und H. SCHNEIDER-BERNLÖHR (11) fanden, daß die Behandlung von E. coli mit Hydrazin und Methylhydrazin zu biochemischen Mangelmutanten führt. Von allen untersuchten Methylhydrazinen hat sich

in der cytostatischen Therapie jedoch bisher nur das Natulan^(R) (4-(2-Methylhydrazinomethyl)-N-isopropylbenzamid) bewährt, das vor allem bei der Therapie der Lymphogranulomatose breite Anwendung findet.

Eingehende Untersuchungen von WEITZEL, SCHNEIDER et al. (10, 12) haben deutlich gemacht, daß das Natulan^(R) bzw. die bei seiner Metabolisierung entstehenden Zwischenprodukte eine Einbauhemmung von Thymidin, Uridin und Leucin in das Ehrlich-Asciteszell-Carcinom der Maus verursachen. Darüber hinaus wird die Bildung von Purindesoxyribosen und Di- und Triphosphaten der Desoxynukleotide gehemmt. Weiterhin kommt es infolge Hemmung des Eintritts von Nukleotiden in die Zelle zu einer Herabsetzung ihres intrazellulären Gehaltes.

Kürzlich berichteten BÖHME und MARTIN (13) über die Darstellung von N-Methyl-N-β-chloräthylhydrazin. Diese Verbindung kann chemisch als Verbindungsglied zwischen den Methylhydrazinen und den cytostatisch wirksamen N-Lost-Verbindungen betrachtet werden. Folglich war es von Interesse, diese Substanz auf wachstumshemmende Eigenschaften zu untersuchen, zumal das N,N-Bis-β-chloräthylhydrazin (14) schon vor längerer Zeit als wirksam bei verschiedenen experimentellen Tiertumoren erkannt wurde, wegen seiner hohen Toxizität jedoch keine größere Bedeutung erlangt hat. Bei Hefezellen (*Sacch. cerevisiae*) konnte von BRAUN und LANGE (15) bereits eine starke Beeinflussung des Zellwachstums und der Zellvermehrung festgestellt werden.

Um die allgemein hohe Toxizität der Hydrazine herabzusetzen, hat man häufig versucht, eine weniger aktive Transportform der jeweiligen Stickstoffverbindung zu finden, die erst am Wirkort ihre volle Aktivität entfaltet. So ist z. B. das Isonicotinsäurehydrazid (2)

in das entsprechende Hydrazone umgewandelt worden, das im Organismus erst nach hydrolytischer Spaltung zum Hydrazin wieder aktiviert wird. Auch beim N,N-Bis-(β -chloräthyl)-hydrazin wurde die Überführung in N,N-Bis-(β -chloräthyl)-hydrazone (16) für aussichtsreich gehalten und durchgeführt. In hierzu entsprechender Weise ist das N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin zum N¹-Methyl-N- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon umgesetzt worden (17), dessen cytostatische Wirkung im Vergleich zu seinem Hydrazin und zum Natulan^(R) untersucht werden soll. Als zweite Vergleichssubstanz neben dem Natulan^(R) wird das N,N-Dimethylhydrazin (asymmetrische Form) herangezogen, um zu untersuchen, ob die Substitution der Methylgruppe durch eine Chloräthylgruppe eine Verstärkung der cytostatischen Wirksamkeit erbringt.

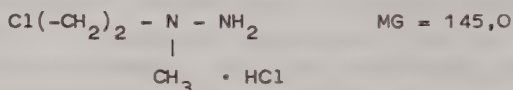
In Anlehnung an die beim Natulan^(R) untersuchten Stoffwechselparameter war es die Aufgabe, in dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit den Thymidin-, Uridin- und Leucin-Einbau in die hoch- und niedermolekularen Bestandteile der Asciteszellen unter dem Einfluß der genannten vier Substanzen zu prüfen. Mit Hilfe der säulenchromatographischen Trennung des kalten Perchlorsäureextraktes an einer PEI-Cellulose-Säule (18) sollte dann im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, inwieweit die Substanzen einen Einfluß auf die Phosphorylierung der aufgenommenen markierten Nukleoside zu Mono-, Di- und Triphosphaten ausüben.

B. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

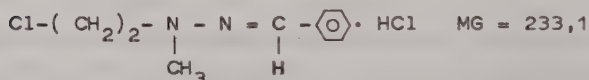
I. M a t e r i a l i e n

1. Als cyto-statisch-wirksame Substanzen wurden verwendet:

- a) N-Methyl-N'-β-chloräthylhydrazin-hydrochlorid
(im folgenden Text als Substanz A bezeichnet)



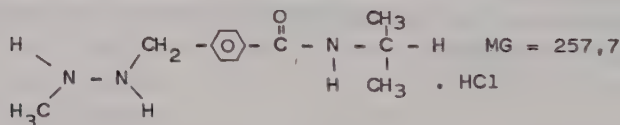
- b) N'-Methyl-N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon-hydrochlorid
(im folgenden Text als Substanz B bezeichnet)



- c) asymmetrisches N,N-Dimethylhydrazin



- d) Procarbäzin (Natulan^(R) der Fa. Hoffmann-La Roche)



2. Zur Markierung wurden folgende Substanzen der Firma Amersham/Buchler, Braunschweig, eingesetzt:

- a) [6-³H]-Uridin 41 mCi/mg
b) [6-³H]-Thymidin 111 mCi/mg
c) L- [U-¹⁴C]-Leucin 348 mCi/mmol

3. Die Asciteszellen wurden bei allen Versuchen in Eagle's Basal-Medium mit "Earle's Salzen" suspendiert (19,20). Zur Herabsetzung der Gerinnung wurde Liquemin^(R) der Fa. Hoffmann-La Roche dem Basalmedium zugegeben, und zwar 2000 I.E./100 ml Puffer.
4. Für photometrische Bestimmungen von RNS, DNS und Protein kamen Reagenzien folgender Zusammensetzung zur Anwendung:
 - a) Orcin-Reagenz (frisch zubereitet): 100 mg FeCl_3 werden in 100 ml konzentrierter HCl gelöst und mit 3,5 ml einer 6 %igen Orcin-Lösung in reinem Alkohol versetzt.
 - b) Burton's Reagenz (frisch zubereitet): 3 g Diphenylamin werden in 200 ml Eisessig + 3 ml konz. H_2SO_4 gelöst.
 - c) Acetaldehyd-Stammlösung: 16 mg Acetaldehyd pro 1,0 ml aq.dest. Von dieser Lösung wird 0,1 ml zu jeweils 20 ml Burton's Reagenz hinzugegeben.
 - d) Biuret-Reagenz: 9,0 g Kalium-Natrium-Tartrat und 3,0 g feinst gepulvertes Kupfersulfat werden vollständig in 400 ml 0,2 n NaOH gelöst. Dann werden 5,0 g Kaliumjodid zugegeben und mit 0,2 n NaOH ad 1000 ml aufgefüllt.
5. Als Szintillationsflüssigkeit wurde eine Lösung auf Dioxan-Basis nach BRAY (21) verwendet.
6. Die säulenchromatographische Trennung erfolgte über PEI-Cellulose (Fa. Merck, Darmstadt) nach PFLÜGER (18).

B. II. Methoden

1. Vorbereitung der Versuchstiere und Gewinnung der Asciteszellen

Zur Entwicklung des Ehrlich-Asciteszell-Carcinoms wurden ausschließlich männliche Albinomäuse des NMRI-Stammes (Ivanovas, Kisslegg) herangezogen. Die Mäuse wurden zu Gruppen von maximal 10 Tieren in Makrolon-Käfigen in einem vollklimatisierten Raum mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten das Trockenfutter Altromin der Fa. Altrogge, Brackwede, und Leitungswasser ad libitum. Nach Eintreffen vom Züchter konnten sich die Tiere eine Woche lang an die Stall- und Ernährungsbedingungen des Institutes gewöhnen, bevor sie zu Versuchen herangezogen wurden. Die Tiere wogen bei Versuchsbeginn ca. 22 - 24 g.

Durchschnittlich 11 Tage nach der Inoculation mit ca. $1,5 \cdot 10^6$ Asciteszellen wurden die Tiere durch Fraktur der Halswirbelsäule getötet und die Tumourflüssigkeit abpunktiert. Das Punktat wurde in 5 ml heparinisiertem Eagle's Basalmedium suspendiert und ohne jede weitere Behandlung nach dem Auszählen der Zellen dem jeweiligen Versuchsansatz zugegeben.

2. Einbauversuche

Während eines Versuches wurde jeweils die Hemmwirkung einer Substanz gegenüber einem unbehandelten Kontrollansatz geprüft. Das Tumorpunktat einer Maus wurde entsprechend einer Endkonzentration von 2-3 Mio Zellen/ml mit heparinisiertem Basalmedium verdünnt und über einen Zeitraum von 2 Stunden im temperierten Wasserbad bei 37° C permanent gerührt. Nach Abnahme der

Ausgangswerte beider Ansätze wird erst die Hemmsubstanz in einer 10^{-3} molaren Konzentration zugegeben. In 20-minütigen Abständen werden je Ansatz 3 mal 3 ml der Ascitessuspension abgenommen und 15 Minuten in Zentrifugengläsern im temperierten Schüttelbad bei 37°C mit $5\text{ }\mu\text{Ci}$ $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-Uridin}$, $1\text{ }\mu\text{Ci}$ $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ und $0,1\text{ }\mu\text{Ci}$ $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Leucin}$ inkubiert. Zum Abbruch der Markierungszeit werden die Proben im Eisbad abgekühlt, mit 7 ml isotonischer NaCl-Lösung versetzt und in der Kälte 2 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das Sediment wird anschließend mit 10 ml eiskalter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert.

3. Extraktion der "säurelöslichen Nukleotide"

Der kalte HClO_4 -Extrakt wird sofort nach dem Waschvorgang (s.o.) hergestellt. Die Asciteszellen werden 20 Minuten mit 2,0 ml 6 %iger Perchlorsäure bei 2°C gerührt. Nach Zentrifugation bei 2°C mit 3000 g über 10 Minuten befinden sich die Nukleo-precursor im klaren Überstand.

4. Extraktion von RNS, DNS und Protein

Nach dem Abheben des die löslichen Nukleobausteine enthaltenden Überstandes wird das Sediment mit 3 ml 6 %iger Perchlorsäure kurz aufgerührt und bei 100°C im Wasserbad hydrolysiert, für RNS- und DNS-Bestimmungen 20 Minuten lang, für Protein-Bestimmungen 15 Minuten. Nach Abkühlen der Proben wird das Hydrolysat 10 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert. Im klaren Überstand befinden sich die RNS- und DNS-Hydrolyseprodukte; die Proteine werden nach dem Abheben des Hydrolysates durch 30minütiges Rühren mit 5,0 ml 0,1 normaler Natronlauge extrahiert.

5. Bestimmung von RNS, DNS, Protein und der löslichen Nukleobausteine

a) RNS (nach BARRENSTEEN und PEEHAM):

Zur photometrischen Bestimmung des gesamten RNS-Gehaltes wurden von 3 ml Hydrolysat 0,5 ml eingesetzt, mit 0,5 ml 6 %iger Perchlorsäure verdünnt und mit 2,0 ml Orcin-Reagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde 20 Minuten bei 80° C im Wasserbad erhitzt, dann in Eis abgekühlt. Die Messung erfolgte im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II. (Eichwert: $E = 0,1 \hat{=} 33 \gamma \text{ RNS/ml}$).

b) DNS (nach BURTON (22)):

Die DNS-Bestimmung wurde nach dem von BURTON angegebenen Verfahren durchgeführt. Vom Hydrolysat wurden 0,5 ml mit 1,0 ml Burton's Reagenz + Acetaldehyd 18 Stunden bei 30° C im Trockenschrank inkubiert. Danach wurde die entstandene Blaufärbung bei 578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. (Eichwert: $E = 0,1 \hat{=} 6,78 \text{ DNS/ml}$).

c) Protein (nach WEICHSELBAUM mod. nach BUCHER):

Zur Proteinbestimmung wurde nach Absaugen des Hydrolysates das Sediment mit 5,0 ml 0,1 normaler Natronlauge 30 Minuten gerührt. Von dieser Suspension wurde 1,0 ml mit 2,0 ml Biuret-Reagenz weitere 30 Minuten gerührt und anschließend bei 3000 g 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei 546 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. (Eichwert: $E = 0,1 \hat{=} 2,77 \text{ mg Protein/ml}$).

d) Lösliche Nukleobausteine

Zur optischen Messung der Basen, Nukleoside und Nukleotide wurden 0,5 ml des kalten Perchlorsäure-Extraktes mit 0,5 ml dest. Wasser verdünnt und bei

260 nm bzw. 285 nm gegen den Leerwert Aq. dest. in 1 cm QS-Küvetten im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II gemessen.

6. Trennung des kalten HClO_4 -Extraktes an einer PEI-Cellulose-Säule

a) Versuchsanordnung und Aufarbeitung des kalten HClO_4 -Extraktes:

Für jeweils eine Versuchsreihe wurde das unverdünnte Asciteszellpunktat verwendet, damit eine ausreichende Menge an Nukleotiden zur Trennung zur Verfügung stand: In je 30 ml heparinisiertem Basalmedium wurde 1 ml unverdünntes Punktat - das entspricht einer Gesamtmenge von ca. 60 Mio Zellen - suspendiert und mit den vier zu prüfenden Substanzen in 10^{-3} molarer Konzentration unter ständigem Rühren im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Der unbehandelte Kontrollansatz wurde gleich behandelt. Nach 50 Minuten wurden den Ansätzen je $50 \mu\text{Ci} [6\text{-}^3\text{H}]\text{-Uridin}$ bzw. $5 \mu\text{Ci} [6\text{-}^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ zugegeben. Nach 15-minütiger Markierungszeit wurden die Proben nach Abs. B.II.3. aufgearbeitet. Der Perchlorsäure-Extrakt wurde tropfenweise mit gekühlter 15 N, bzw. 0,1 N Kalilauge mit Hilfe einer Glaselektrode auf pH 6.7 - 7.0 eingestellt. Der neutralisierte Kaltextrakt wurde etwa 1 Stunde in Eis gekühlt und anschließend 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gefriergetrocknet und der Rückstand für die Säulenchromatographie verwendet.

b) Bereitung der PEI-Säule:

50 g PEI-Cellulose wurden in 300 ml 1,0 N Kochsalzlösung suspendiert, kräftig gerührt und anschließend stehengelassen. Nach dem Absetzen der Zellulose wurde der leicht trübe Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde viermal wiederholt. Die so vorbereitete

Zellulosesuspension wurde entgast und in Glassäulen von 240 mm Länge und 9 mm innerem Durchmesser gefüllt. Nach Absetzen des Ionenaustauschers wurde die überstehende NaCl-Lösung abtropfen lassen und mit ca. 50 ml destilliertem Wasser nachgewaschen. Dann wurde der gefriergetrocknete kalte HClO_4 -Extrakt aufgetragen, indem der Rückstand in 3,0 ml Aq. bidest. gelöst und auf die Säule aufgetragen wurde.

c) Versuchsanordnung und zeitlicher Ablauf der Trennung:

Zur Eluierung der Nukleobasen wurde zunächst Aq. bidest. mit einem Flow von 16 ml/h über die Säule gepumpt. Nach etwa 3 Stunden wurde der NaCl-Gradient angeschlossen, d.h. 4 m NaCl-Lösung wurde mit einem Flow von 4 ml/h in ein Gradientenmischgefäß mit vorgelegten 250 ml Aq. bidest. gepumpt und die Gradientenlösung mit 16 ml/h über die Säule geführt. Die Extinktion des Eluats wurde fortlaufend bei 260 nm mit einem LKB-Uvicord gemessen und registriert, das Eluat wurde zu Fraktionen von je 2,5 ml im LKB-Radi-Rac gesammelt. Bis maximal 140 Fraktionen wurden aufgefangen.

7. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

Zur Messung der Radioaktivität wurden die HClO_4 -Extrakte mit 6 %iger Kalilauge neutralisiert, das KClO_4 abzentrifugiert, 1 ml des Überstandes mit 10 ml Bray'scher Lösung gemischt und im Szintillationszähler (Nuclear Chicago Mark II) gemessen.

Zur Bestimmung der Leucin-Aktivität in Protein wurden nach der Extraktion mit 0,1 n Natronlauge die Zellrückstände abzentrifugiert und 1,0 ml des klaren Überstandes mit 10 ml Bray'scher Lösung versetzt und gemessen..

Bei der säulenchromatographischen Trennung wurde von den je 2,5 ml Eluat 1,0 ml eingesetzt. Die ausgedruckten cpm-Werte wurden in dpm-Werte umgerechnet und für die Ermittlung der Gesamtaktivität mit folgenden Faktoren multipliziert:

- a) für den HClO_4 -Kaltextrakt bei den Einbauversuchen
 $F = 6,0$, bei der Säulenchromatographie $F = 2,5$
- b) für das HClO_4 -Hydrolysat $F = 9,0$
- c) für den NaOH-Protein-Extrakt $F = 5,0$.

8. Auswertung der Ergebnisse

a) Einbauversuche:

Für die Einbauraten von Thymidin, Uridin und Leucin wurden die dpm-Werte sowohl für den Kaltextrakt als auch für die hochmolekularen DNS, RNS, Proteine ermittelt. Der Ausgangswert wurde für die Kontrolle wie für die Proben = 1 gesetzt. Für die Einbauraten zu den folgenden Zeitpunkten wurde der Faktor bezogen auf den Ausgangswert errechnet. Um die behandelten Proben mit der Kontrolle vergleichen zu können, wurden die Kontroll-dpm-Werte für jeden Zeitpunkt als 100 % angenommen und die darauf bezogenen entsprechenden Faktoren der Proben-dpm-Werte in Prozent angegeben.

Die Gesamt-dpm-Werte setzen sich aus den dpm-Werten des kalten HClO_4 -Extraktes und den dpm-Werten der DNS-, RNS- und Proteinbestimmungen zusammen. Die absoluten Werte wurden ebenfalls umgerechnet und die Einbauhemmung unter dem Einfluß der vier Substanzen prozentual gegenüber der Kontrolle ausgedrückt.

Zur Beurteilung der Syntheseleistung unter dem Einfluß der vier Hemmsubstanzen, wurde der Quotient Syntheseeinbau : Gesamtaufnahme gebildet, die absoluten Werte auf den Ausgangswert 1 umgerechnet und prozentual gegenüber der Kontrolle ausgedrückt.

b) Säulenchromatographische Trennung:

Zunächst wurden von jeder Fraktion die dpm-Werte ermittelt und die Extinktionen bei 260 nm gegen den Leerwert Aq. dest gemessen. Zur Ermittlung der prozentualen Verteilung der gemessenen Einbauraten auf die entsprechenden Basen, Mono-, Di- und Triphosphate wurden die einzelnen dpm-Werte der Peaks addiert. Die so ermittelten 4 Werte für Kontroll- und Probenansätze wurden in ihrem Verhältnis zueinander prozentual berechnet. Die Summe der vier Peaks entspricht dabei jeweils 100 %. Um die Verschiebung der Aktivitätsanteile unter dem Einfluß der vier Substanzen besser beurteilen zu können, wurden die 4 Kontrollwerte wiederum zu je 100 % angenommen und die entsprechenden Aktivitätsanteile der Probenansätze prozentual zur Kontrolle angegeben.

C. ERGEBNISSE

I. Einbauversuche

1. Hemmung des Thymidineinbaus unter Einwirkung der vier Substanzen

- a) Der Einfluß auf den Thymidineinbau durch N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydrazin-hydrochlorid:
(im folgenden Text als Substanz A bezeichnet).

Unter der Substanz A kommt es schon nach kurzer Zeit zu einem starken Anstieg der Aktivität in den säurelöslichen Nukleobausteinen der Zelle. Der Thymidingehalt liegt zum Zeitpunkt 40 Minuten bei 154 % gegenüber der Kontrolle (Kontrolle immer 100 %). Anschließend erfolgt ein steiler Abfall, der nach 60 Minuten nur noch 88 % der Kontrolle beträgt und während der zweiten Stunde bis auf 67 % zurückgeht (Tabelle 1a).

Im Gegensatz dazu wird der Thymidineinbau in die DNS sofort stark gehemmt. Bereits zum Zeitpunkt 60 Minuten ist der maximale Hemmeffekt erreicht, die Einbaurate beträgt hier nur noch 15 % der Kontrolle. Eine wesentliche Änderung der Werte, d.h. eine Verstärkung oder Nachlassen der Wirkung von Substanz A ist im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr festzustellen (Tabelle 1 b).

Auch bei dem insgesamt in die Zelle aufgenommenen Thymidin zeigt die Substanz A bereits nach 20 Minuten eine deutliche Hemmung. Die Raten sinken bis auf knapp 30 % des Kontrollwertes konstant ab. Der größere Teil des aufgenommenen Thymidin verbleibt im löslichen HClO_4 -Kaltextrakt, während geringere Mengen in die DNS eingebaut werden (Tabelle 1 c). Diese Tatsache wird erhellt durch das Verhältnis Gesamtaktivität : Aktivität in der hochmolekularen DNS. Die Werte zeigen deutlich den kontinu-

ierlichen Abfall unter der Einwirkung der Substanz und demonstrieren, daß die Hauptmenge der aufgenommenen Aktivität nicht zur Synthese von DNS herangezogen wird (Tabelle 1 d).

Tabelle 1a: [$6\text{-}^3\text{H}$]-Thymidin-Einbauraten in den kalten HClO_4 -Extrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	6740=	6600=	
0	1,00	1,00	100 %
20	0,97	1,18	122 %
40	0,79	1,22	154 %
60	1,14	1,00	88 %
80	1,03	0,77	75 %
100	1,03	0,70	68 %
120	1,18	0,79	67 %

Tabelle 1b: [$6\text{-}^3\text{H}$]-Thymidin-Einbauraten in die DNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	16890=	18210=	
0	1,00	1,00	100 %
20	0,88	0,58	66 %
40	0,79	0,31	39 %
60	1,05	0,16	15 %
80	1,09	0,15	14 %
100	1,40	0,15	11 %
120	1,08	0,14	13 %

Tabelle 1c: [$6\text{-}^3\text{H}$]-Thymidin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	23630=	24810=	
0	1,00	1,00	100 %
20	0,90	0,74	82 %
40	0,79	0,55	70 %
60	1,07	0,38	36 %
80	1,07	0,32	30 %
100	1,29	0,29	22 %
120	1,11	0,31	28 %

Tabelle 1d: DNS-Einbausraten/Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	71,5= 100 %	73,3= 100 %	1
20	69,3 - 97,1 %	53,3 - 72,7 %	0,75
40	71,4 - 99,9 %	41,2 - 56,2 %	0,56
60	69,8 - 97,6 %	30,1 - 41,1 %	0,42
80	72,5 - 101,5 %	34,8 - 47,4 %	0,47
100	77,3 - 108,3 %	37,0 - 50,5 %	0,44
120	69,6 - 97,4 %	32,0 - 43,6 %	0,45

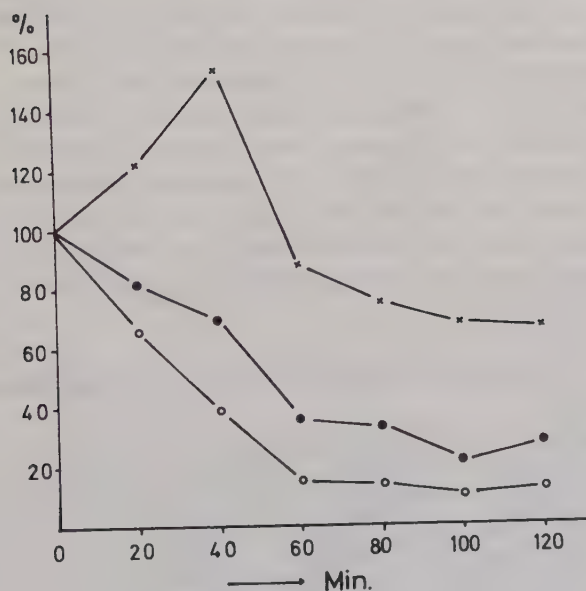


Abb. 1: $[6-^3\text{H}]$ -Thymidineinbau unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A
 (x — x : HClO_4 -Extrakt; o — o : DNS;
 • — • : Gesamtaufnahme)

- b) Der Einfluß auf den Thymidineinbau durch N'-Methyl-N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon-Hydrochlorid (im folgenden Text Substanz B):

Im Gegensatz zu Substanz A bewirkt die Substanz B keinen anfänglichen Anstieg der Aktivität im löslichen HClO_4 -Extrakt, sondern es kommt zu einem sofortigen Abfall gegenüber den Kontrollwerten. Nach 60 Minuten beträgt der radioaktive Thymidingehalt nur noch 68 % und fällt nach 2 Stunden bis auf 31 % der Kontrolle ab (Tabelle 2a). Der Thymidineinbau in die DNS wird ebenfalls von Anfang an stark gehemmt. Nach einem Absinken der Einbauraten auf 57 % schon zum Zeitpunkt 20 Minuten wird bei Versuchsende eine Einbaurate von knapp 32 % erreicht (Tabelle 2b). Aus dem Verlauf der Kurve für das insgesamt in die Zelle aufgenommene Thymidin läßt sich ebenfalls von Anfang an eine starke Hemmung der Gesamtaufnahme von Aktivität erkennen. Die Einbauraten fallen - mit leichten Schwankungen - kontinuierlich auf 33 % des Kontrollwertes ab. Eine ungleiche Verteilung zwischen Zell-Pool und DNS läßt sich nicht erkennen, was die Tabelle 2d deutlich machen soll (Tabellen 2c und d).

Tabelle 2a: $[6\text{-}^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbauraten in den HClO_4 -Extrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	14700	13880	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,03	0,80	78 %
40	1,08	0,82	76 %
60	1,20	0,81	68 %
80	0,82	0,70	85 %
100	0,66	0,26	39 %
120	0,51	0,16	31 %

Tabelle 2 b: $[6-^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaurationen in die DNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	13.110	13.800	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,97	0,55	57 %
40	0,99	0,65	66 %
60	1,06	0,44	42 %
80	0,61	0,35	57 %
100	0,54	0,26	48 %
120	0,53	0,17	32 %

Tabelle 2 c: $[6-^3\text{H}]$ -Thymidin-Gesamteinbaurationen

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	27.810	27.680	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,00	0,68	68 %
40	1,04	0,74	71 %
60	1,13	0,62	55 %
80	0,72	0,52	72 %
100	0,60	0,26	43 %
120	0,52	0,17	33 %

Tabelle 2 d: DNS-Einbaurationen / Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	47,1	49,9	
0	= 100 %	= 100 %	1
20	45,5- 96,6%	40,3-80,9 %	0,85
40	45,1- 95,9%	44,1-88,2 %	0,92
60	44,0- 93,4%	35,1-70,3 %	0,75
80	39,7- 84,3%	32,9-65,9 %	0,78
100	42,1- 89,5%	50,6-101,5%	1,13
120	47,9-101,8%	50,8-102,0%	1,00

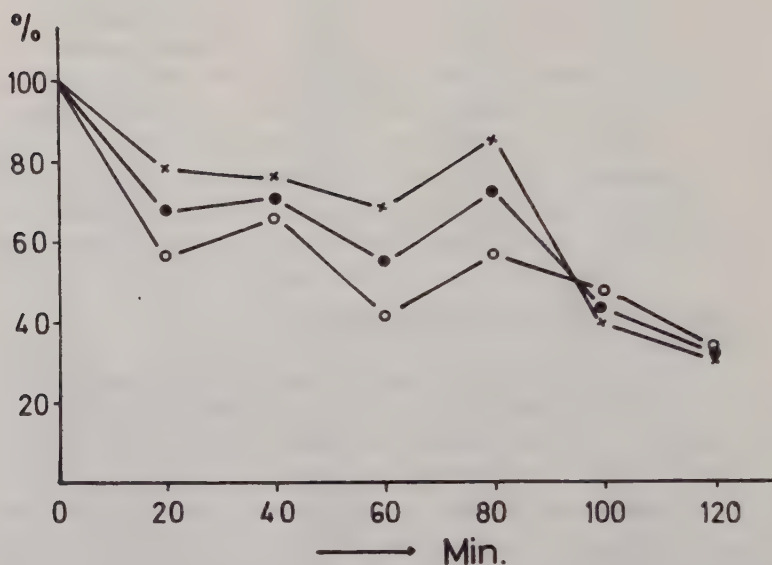


Abb. 2: $[6-^3\text{H}]$ -Thymidineinbau unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz B. (x — x : HClO_4 -Extrakt; . — . : Gesamtaufnahme; o — o : DNS)

c) Der Einfluß auf den Thymidineinbau durch N,N-Dimethylhydrazin:

Der Einfluß dieser Substanz auf die Aufnahme von Thymidin in den Kaltextrakt der Zelle ist ähnlich dem der Substanz A. Bis zum Zeitpunkt 80 Minuten besteht ein Anstieg auf 132 % des Kontrollwertes. Nach 2 Stunden ist etwa der Kontrollwert wieder erreicht (Tabelle 3 a).

Im Gegensatz dazu wird der Thymidineinbau in die DNS nachhaltig beeinflusst. Die Raten sinken kontinuierlich bis

auf 55 % der Kontrolle ab (Tabelle 3 b).

Die insgesamt aufgenommene Aktivität liegt bis zur 80. Minute etwa beim Kontrollwert. Erst dann kommt es zu einem leichten Rückgang auf 80 % (Tabelle 3 c). Auch hier soll die Tabelle 3 d verdeutlichen, daß von der insgesamt aufgenommenen Aktivität nur ein Teil für die DNS-Synthese verwendet wird.

Tabelle 3 a: [$6\text{-}^3\text{H}$]-Thymidin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	28.200	30.840	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,01	1,10	109 %
40	1,02	1,26	124 %
60	0,98	1,22	124 %
80	0,99	1,31	132 %
100	1,05	0,87	83 %
120	0,77	0,81	105 %

Tabelle 3 b: [$6\text{-}^3\text{H}$]-Thymidin-Einbauraten in die DNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	21.630	23.610	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,25	1,17	94 %
40	1,17	0,97	83 %
60	0,90	0,72	80 %
80	0,92	0,68	74 %
100	0,83	0,46	55 %
120	0,73	0,40	55 %

Tabelle 3 c: (6-³H)-Thymidin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	49,830	54,450	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,12	1,13	101 %
40	1,08	1,09	101 %
60	0,95	0,98	103 %
80	0,96	1,04	108 %
100	0,96	0,69	72 %
120	0,75	0,63	84, %

vgl. Abb. 3, Seite 21.

Tabelle 3d: DNS-Einbauraten: Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	43,4	43,4	
0	= 100 %	= 100 %	1,00
20	48,7-112 %	44,8-103,2 %	0,92
40	46,9-108 %	34,5- 79,5 %	0,86
60	35,2- 81 %	31,7- 73,0 %	0,90
80	41,6-95,7 %	28,5- 65,6 %	0,68
100	37,7-86,7 %	28,9- 66,6 %	0,77
120	42,2-97,0 %	27,5- 63,4 %	0,66

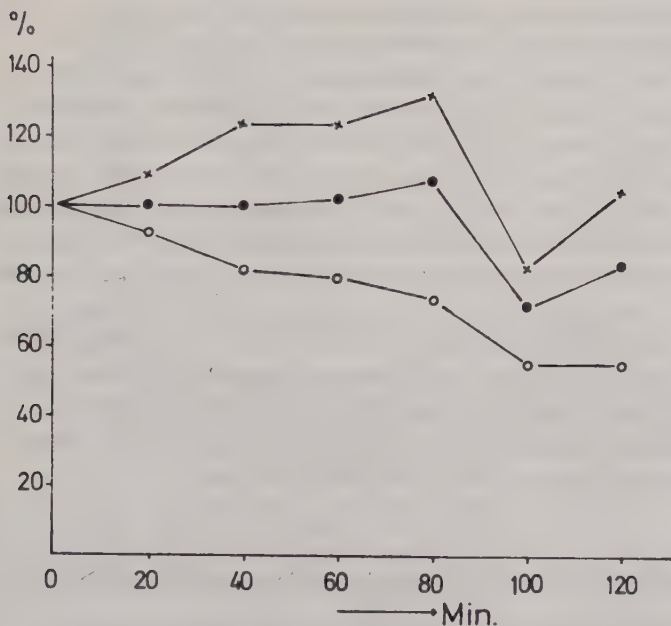


Abb. 3: Der ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidineinbau unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. von N,N-Dimethylhydrazin
(x — x : HClO_4 -Extrakt, • — • : Gesamtaufnahme; o — o : DNS)

d) Der Einfluß auf den Thymidineinbau durch Procarbazin:

Die Wirkung des Procarbazin auf die Thymidinaufnahme in das Säurelösliche der Zelle wird erst nach 40 Minuten sichtbar. Bis zum Zeitpunkt 80 Minuten ist der maximale Hemmeffekt eingetreten, die Einbaurrate beträgt nur noch 54 % der Kontrolle. Der leichte Anstieg auf 60 % gegen Versuchsende liegt noch innerhalb der Fehlergrenze (Tab.4a). Der zu beobachtende Effekt auf den Thymidineinbau in die DNS ist sehr gering, zum Zeitpunkt 80 Minuten ist die gemessene Aktivität, nach anfangs leichtem Anstieg über 100 %, erst auf 89 % abgefallen. Der dann folgende, etwas

stärkere Effekt - die Einbaurate sinkt auf 74 % - ist nur von kurzer Dauer. Am Ende der Versuchszeit ist der aktive Thymidingehalt der DNS wieder zur Norm angestiegen. Dieses Ergebnis stimmt mit den von WEITZEL, SCHNEIDER et al. (10) beschriebenen Werten durchaus überein (Tab.4b). Die Menge der Gesamtaktivität liegt etwa bis zur 40. Minute in Höhe der Kontrollwerte; erst dann beginnt der verstärkte Abfall der Thymidinaufnahme in den Zellpool sich hier auszuwirken. Der stärkste Hemmeffekt ist zum Zeitpunkt 100 Minuten zu beobachten, hier sinkt der Wert auf 66 % gegenüber der Kontrolle ab. Gegen Ende der zwei Versuchsstunden erfolgt dann ein leichter Wiederanstieg auf 82 % (Tab. 4c). Die Werte der Tabelle 4d demonstrieren, daß sich die Aufnahmehemmung weitgehend im niedermolekularen Bereich auswirkt und weniger in der hochmolekularen DNS.

Tabelle 4a: (6-³H)-Thymidin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	18.980	20.360	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,74	0,63	85 %
40	0,72	0,75	104 %
60	1,24	0,85	69 %
80	1,26	0,68	54 %
100	1,13	0,68	60 %
120	0,74	0,45	61 %

Tabelle 4b: (6-³H)-Thymidin-Einbaurate in die DNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	17.430	16.290	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,82	0,92	112 %
40	1,00	1,00	100 %
60	1,03	0,94	91 %
80	0,98	0,87	89 %
100	0,80	0,59	74 %
120	0,74	0,81	109 %

Tabelle 4 c: ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidin-Gesamteinbausraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	36.410	36.650	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,78	0,76	97 %
40	0,85	0,86	101 %
60	1,14	0,89	78 %
80	1,13	0,77	68 %
100	0,97	0,64	66 %
120	0,74	0,61	82 %

vgl. Abb. 4

Tabelle 4 d: DNS-Einbausraten: Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	47,9 = 100 %	44,5=100 %	1,00
20	50,3 = 105 %	53,6=120 %	1,14
40	56,2 = 117 %	51,4=115 %	0,98
60	43,3 = 91 %	47,0=106 %	1,17
80	41,7 = 87 %	50,4=113 %	1,30
100	39,2 = 82 %	41,3= 93 %	1,13
120	47,8 = 100 %	58,8=132 %	1,32

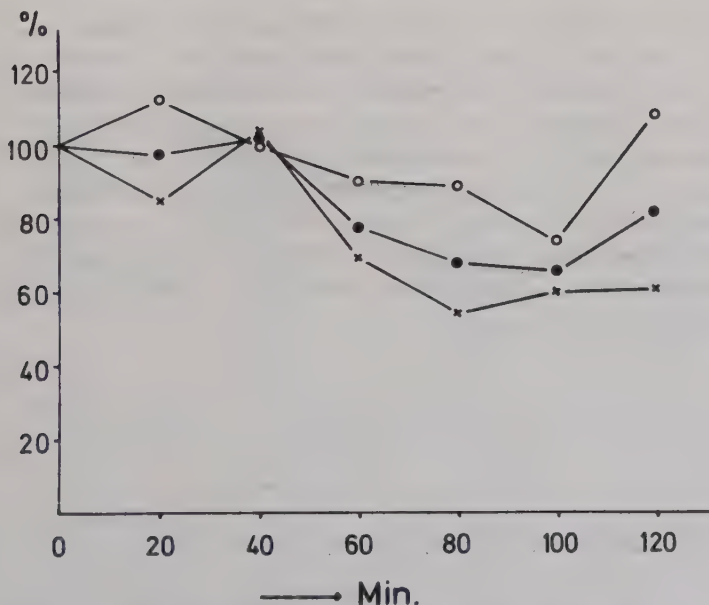


Abb. 4: Der ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidineinbau unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. Procarnbazin (x—x: HClO_4 -Extrakt; • — •: Gesamtaufnahme; o—o: DNS)

2. Hemmung des Uridineinbaus unter Einwirkung der vier Substanzen

a) Der Einfluß auf den Uridineinbau durch die Substanz A:

Die Substanz A zeigt keinerlei Hemmwirkung auf die Uridinaufnahme in den säurelöslichen Anteil der Ascitestumorzelle. Es kommt vielmehr etwa ab der 20. Minute im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg der Aktivität. Zum Zeitpunkt 60 Minuten ist ein Maximum mit 134 % erreicht. Anschließend folgt zwar bis zur 80. Minute ein leichter Abfall, doch liegt die gemessene Aktivität zu keinem Zeitpunkt unter 100 % (Tabelle 5 a).

Ganz im Gegensatz hierzu steht das Verhalten der Uridinaufnahme in die RNS. Die gemessene Aktivität fällt kontinuierlich ab und erreicht nach 120 Minuten nur noch 23 % des Kontrollwertes (Tabelle 5 b).

Bei dem insgesamt in die Zelle aufgenommenen Uridin läßt sich bis zu einer Stunde nach Zugabe der Substanz A fast keine Veränderung gegenüber der Kontrolle erkennen. Erst dann erfolgt eine langsame Verminderung der Gesamtaktivität auf 74 % bei Versuchsende (Tabelle 5c).

Es zeigt sich also, daß insgesamt weniger Uridin aufgenommen wird als von den unbehandelten Zellen, hiervon aber der weitaus größte Teil im löslichen HClO_4 -Extrakt verbleibt und nur in geringem Maße für die RNS-Synthese verwendet wird (Tabelle 5 d).

Tabelle 5a: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	2.134.770	1.770.870	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,01	0,95	94 %
40	0,99	1,31	132 %
60	1,01	1,35	134 %
80	1,01	1,08	107 %
100	0,96	1,04	108 %
120	0,97	1,04	107 %

Tabelle 5b: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in die RNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	1.401.300	1.274.625	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,97	0,85	88 %
40	0,94	0,57	61 %
60	0,90	0,43	48 %
80	0,94	0,43	46 %
100	0,92	0,30	33 %
120	0,95	0,22	23 %

Tabelle 5c: (6-³H)-Uridin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.536.070	3.045.495	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,99	0,91	92 %
40	0,97	0,99	102 %
60	0,97	0,96	99 %
80	0,98	0,81	83 %
100	0,95	0,73	77 %
120	0,95	0,70	74 %

Tabelle 5d: RNS-Einbauraten: Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
0	39,6 = 100 %	41,9 = 100 %	1,00
20	38,8	39,1	0,96
40	38,3	23,8	0,60
60	36,9	18,5	0,49
80	37,9	22,2	0,54
100	38,4	17,2	0,43
120	39,6	13,0	0,31

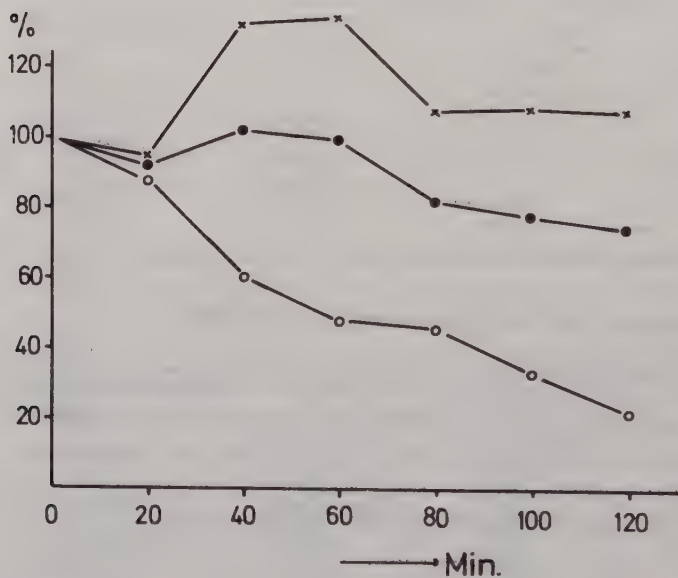


Abb. 5: Der (6-³H)-Uridineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (x — x: HClO₄-Extrakt; · — · : Gesamtaufnahme; o — o: RNS)

b) Der Einfluß auf den Uridineinbau durch die
Substanz B:

Im Gegensatz zur Substanz A zeigt die Substanz B eine sofortige ausgeprägte Wirkung auf den Uridineinbau in das Säurelösliche. Schon nach 20 Minuten können nur noch 60 % der von der Kontrolle gemessenen Aktivität festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 120 Minuten beträgt die Einbaurrate nur noch 3 % (Tabelle 6a).

Die Uridinaufnahme in die RNS wird abrupt gebremst. Hier liegen die Einbauraten bei den Zeitpunkten 20 bzw. 120 Minuten nur bei 54 % bzw. 2 % im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 6 b).

Die Kurve der Gesamtaktivität verläuft in diesem Fall parallel zu den Einbauraten in Zellpool und RNS. Hier wird eine fast 100 %ige Aufnahmehemmung durch die Substanz B besonders deutlich (Tabelle 6 c).

Die Konstanz des Verhältnisses Aktivität in der RNS zu aufgenommener Gesamtaktivität macht deutlich, daß hier die Wirkung schwerpunktmäßig in einer Hemmung der Gesamtaufnahme und kaum in einer ungleichen Verteilung des markierten Uridins zwischen nieder- und hochmolekularen Anteilen liegt (Tabelle 6 d).

Tabelle 6 a: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	2.134.770	1.766.460	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,01	0,61	60 %
40	0,99	0,54	55 %
60	1,01	0,44	44 %
80	1,01	0,34	34 %
100	0,96	0,27	28 %
120	0,97	0,03	3 %

Tabelle 6 b: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in die RNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	1.401.300	1.111.500	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,97	0,52	54 %
40	0,94	0,38	40 %
60	0,90	0,36	40 %
80	0,94	0,36	38 %
100	0,92	0,26	28 %
120	0,95	0,02	2 %

Tabelle 6 c: (6-³H)-Uridin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.536.070	2.877.960	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,99	0,57	58 %
40	0,97	0,48	49 %
60	0,97	0,41	42 %
80	0,98	0,35	36 %
100	0,95	0,27	28 %
120	0,95	0,02	2,1 %

vgl. Abb. 6, S. 29

Tabelle 6 d: RNS-Einbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	39,6 = 100 %	38,6 = 100 %	1,00
20	38,8	35,1	0,93
40	38,3	30,4	0,82
60	36,9	34,3	0,95
80	37,9	39,7	0,95
100	38,4	37,5	1,00
120	39,6	38,7	1,00

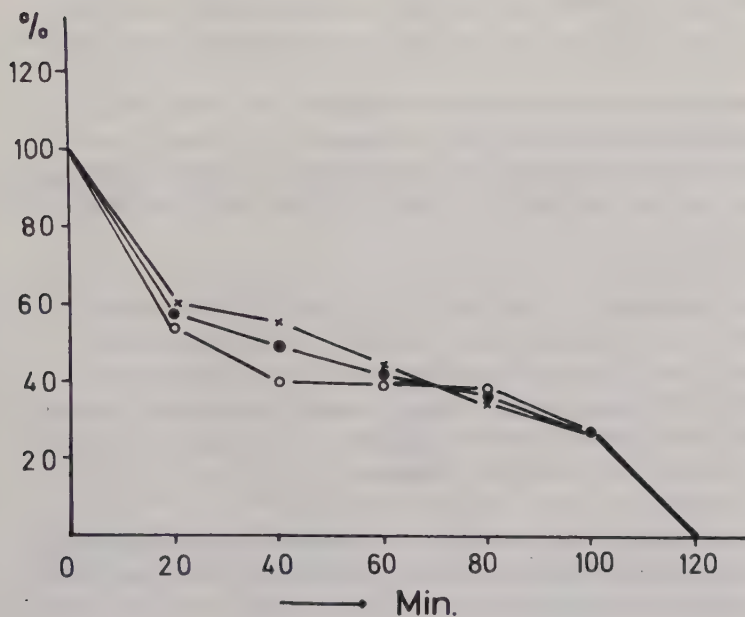


Abb. 6: Der (6-³H)-Uridineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. Substanz B
(x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme; o — o : RNS)

c) Der Einfluß auf den Uridineinbau durch
N,N-Dimethylhydrazin:

Auf die Uridinaufnahme in das Säurelösliche der Zelle übt das N,N-Dimethylhydrazin in der ersten Stunde praktisch keine hemmende Wirkung aus. Erst nach 60 Minuten fallen die Raten auf 71 % ab, um dann wieder langsam bis auf 81 % des Kontrollwertes anzusteigen (Tab. 7a).

Der Uridineinbau in die RNS dagegen ist gleich von Anfang an betroffen. Wenn die Einbauraten zuerst auch nur langsam abfallen, so werden doch zu den Zeitpunkten 100 und 120 Minuten nur noch 30 % bzw. 35 % des Kontrollwertes erreicht (Tabelle 7 b).

Die Gesamtaktivitäten verhalten sich im vorliegenden Fall ähnlich wie die Einbauraten in das Säurelösliche. Auch hier wird der Hemmeffekt erst nach 60 Minuten deutlich. Im weiteren Verlauf liegen die Werte - ähnlich wie unter dem Einfluß der Substanz A - immer über den Einbauraten in die RNS (Tabelle 7 c).

Es verbleibt also auch hier anscheinend ein großer Teil des aufgenommenen Uridins im niedermolekularen Bereich liegen (Tabelle 7 d).

Tabelle 7 a: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	2.555.100	2.290.350	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,98	1,00	102 %
40	0,95	1,01	106 %
60	0,97	0,96	99 %
80	1,13	0,81	72 %
100	1,01	0,75	74 %
120	0,95	0,77	81 %

Tabelle 7 b: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in die RNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	987.345	1.034.190	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,96	0,90	94 %
40	0,92	0,82	89 %
60	0,98	0,54	55 %
80	1,01	0,48	48 %
100	1,05	0,32	30 %
120	0,95	0,33	35 %

Tabelle 7 c: (6-³H)-Uridin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	3.542.445	3.324.540	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,98	0,97	99 %
40	0,94	0,95	101 %
60	0,97	0,83	86 %
80	1,10	0,71	65 %
100	1,02	0,62	61 %
120	0,95	0,63	66 %

vgl. Abb. 7, Seite 32

Tabelle 7 d: RNS-Einbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
0	27,9 = 100 %	31,1 = 100 %	1,00
20	27,3	28,9	0,95
40	27,3	26,8	0,88
60	27,9	20,3	0,64
80	25,6	20,9	0,74
100	28,8	16,2	0,49
120	27,9	13,1	0,53

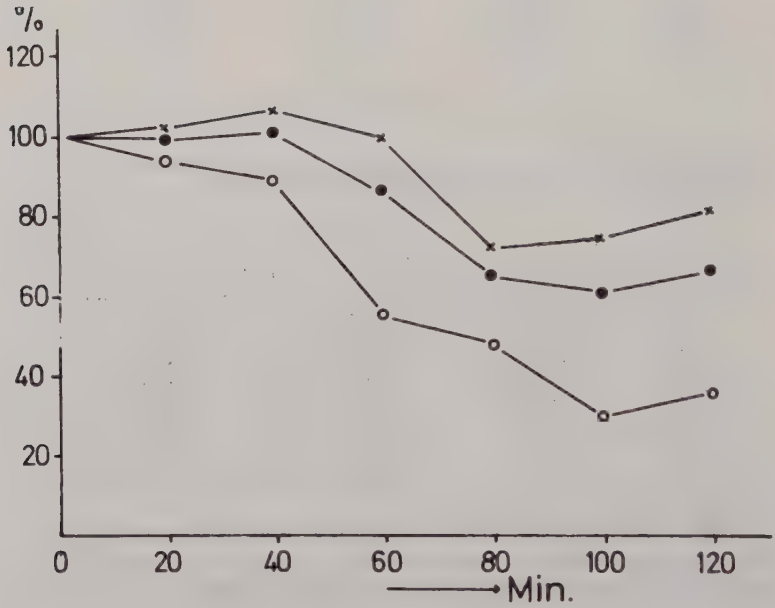


Abb. 7: Der (6-³H)-Uridineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. von N,N-Dimethylhydrazin (x — x: HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme; o — o : RNS)

d) Der Einfluß auf den Uridineinbau durch Procarbazin:

Die Wirkung des Natulan^(R) auf die Uridinaufnahme in das Säurelösliche der Ascitestumorzelle setzt relativ spät ein, erst nach 40 Minuten erkennt man ein langsames Abfallen der Einbauraten. Der größte Hemmeffekt ist nach 100 Minuten mit 73 % gegenüber der Kontrolle erreicht. Gegen Versuchsende ist ein Wiederanstieg auf 85 % zu verzeichnen (Tabelle 8 a).

Die RNS-Einbauraten zeigen ein ähnliches Verhalten. Auch hier setzt die Wirkung erst nach 40 Minuten ein; die Einbauraten erreichen ihr Minimum von 45 % nach 100 Minuten, um auch hier während der letzten 20 Minuten wieder etwas anzusteigen (Tabelle 8 b).

Die Kurve der Gesamtaktivität läuft parallel zu den Einbauraten in Zellpool und RNS, doch liegen auch hier die Werte näher bei den Einbauraten in den HClO₄-Kaltextrakt (Tabelle 8 c).

Gegenüber den Literaturangaben (10) tritt die hier beobachtete Einbauhemmung von Uridin in die RNS etwas später ein, ist jedoch bei Versuchsende etwas stärker.

Die Tabelle 8 d verdeutlicht wiederum die verstärkte Aufnahmehemmung des Uridins in die hochmolekularen Zellanteile.

Tabelle 8 a: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	2.555.100	2.297.550	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,98	0,99	101 %
40	0,95	1,00	105 %
60	0,97	0,92	95 %
80	1,13	0,86	76 %
100	1,01	0,74	73 %
120	0,95	0,81	85 %

Tabelle 8 b: (6-³H)-Uridin-Einbauraten in die RNS

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	987.345	907.200	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,96	1,02	106 %
40	0,92	1,01	109 %
60	0,98	0,67	68 %
80	1,01	0,57	56 %
100	1,05	0,47	45 %
120	0,95	0,48	51 %

Tabelle 8 c: (6-³H)-Uridin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.542.445	3.204.750	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,98	1,00	102 %
40	0,94	1,00	106 %
60	0,97	0,85	88 %
80	1,10	0,78	71 %
100	1,02	0,66	65 %
120	0,95	0,72	76 %

vgl. Abb. 8, Seite 35

Tabelle 8 d: RNS-Einbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	27,9 = 100 %	28,3 = 100 %	1,00
20	27,3	28,9	1,04
40	27,3	28,5	1,03
60	27,9 = 100 %	22,3	0,77
80	25,6	20,6	0,79
100	28,8	20,0	0,69
120	27,9 = 100 %	18,9	0,67

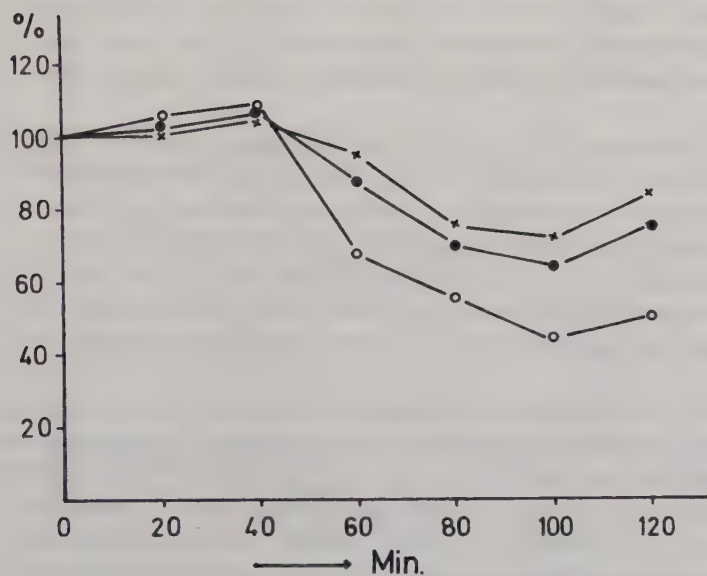


Abb. 8: Der (6-³H)-Uridineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. Procarbazin
(x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamt-
aufnahme; o — o : RNS)

3. Die Hemmung des Leucineinbaus unter der Einwirkung der vier Substanzen

a) Der Einfluß auf den Leucineinbau durch die Substanz A:

Auch auf die Aufnahme von Leucin in den säurelöslichen Kaltextrakt scheint die Substanz A keine hemmende Wirkung auszuüben. Eher könnte man nach den vorliegenden Ergebnissen im Vergleich zur Kontrolle von einem leichten Anstieg des aktiven Leucins sprechen (Tabelle 9 a).

Im Gegensatz hierzu wirkt die Substanz A relativ stark auf den Leucineinbau in das Protein. Allerdings setzt diese Wirkung etwas verzögert ein; erst nach 20 Minuten beginnt ein steiler Abfall der Einbauraten, die nach 60 Minuten ihr Minimum mit 39 % des Kontrollwertes erreichen. Danach halten sich die Werte bis zu Versuchsende auf dem Niveau um 40 % der Kontrolle (Tabelle 9 b).

Aus der errechneten Gesamtaktivität, die nach 20 Minuten bis zu 80 Minuten leicht auf 75 % abfällt, dann aber wieder fast zur Norm zurückkehrt - ein Effekt, der in ähnlicher Art auch schon bei der Wirkung dieser Substanz A auf den Thymidin - und Uridineinbau sichtbar wurde - läßt sich wieder erkennen, daß hier ausreichend aufgenommene Proteinbausteine nicht in dem entsprechenden Maße für die Proteinsynthese verwendet werden (Tabellen 9 c, 9 d).

Tabelle 9 a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in den Kaltextrakt.

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.540	3.820	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,84	0,96	114 %
40	0,79	0,83	106 %
60	0,79	0,87	110 %
80	0,90	0,80	89 %
100	0,74	0,91	122 %
120	0,62	0,75	120 %

Tabelle 9 b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in die Proteine

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	1.667	1.667	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,06	1,02	96 %
40	1,11	0,53	48 %
60	1,08	0,42	39 %
80	1,06	0,49	46 %
100	0,97	0,51	53 %
120	0,89	0,38	43 %

Tabelle 9 c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	5.207	5.487	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,91	0,98	108 %
40	0,89	0,74	83 %
60	0,88	0,74	84 %
80	0,95	0,71	75 %
100	0,81	0,79	98 %
120	0,71	0,64	90 %

vgl. Abb. 9, Seite 38

Tabelle 9 d: Proteineinbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	32,0 = 100 %	30,8 = 100 %	1,00
20	37,2	31,6	0,89
40	39,9	21,7	0,57
60	39,1	17,3	0,46
80	35,7	21,1	0,61
100	38,2	19,7	0,54
120	40,3	18,1	0,48

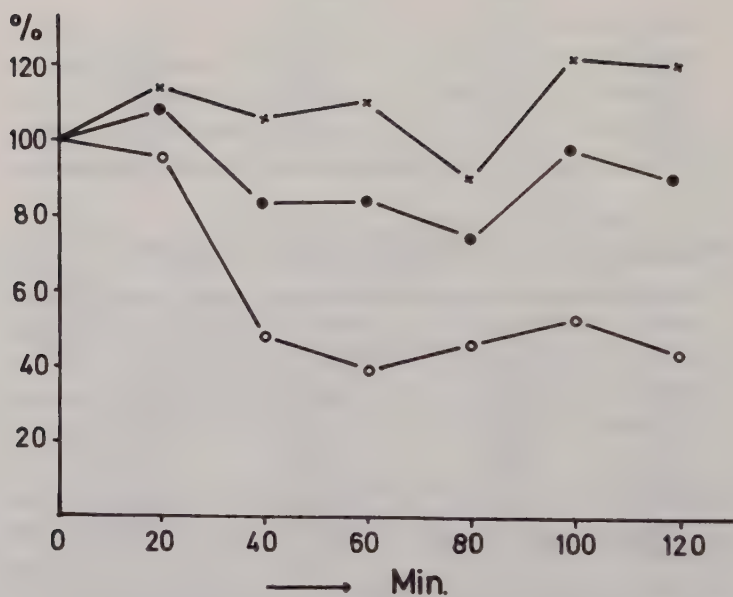


Abb. 9: Der L-(U-¹⁴C)-Leucineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A
(x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme; o — o : Protein).

b) Der Einfluß auf den Leucineinbau durch die Substanz B:

Eine Hemmwirkung der Substanz B auf die Aufnahme von Leucin in den Kaltextrakt der Zelle läßt sich erst sehr spät erkennen. Bis zu 60 Minuten liegen die Einbauraten praktisch bei der Norm. Dann setzt allerdings ein plötzlicher, relativ starker Abfall der Aktivitäten bis auf 40 % der Kontrolle ein (Tabelle 10 a).

Der Leucineinbau in das Protein ist dagegen von Anfang an stark betroffen. Hier kommt es im Laufe der zweistündigen Versuchszeit zu einem kontinuierlichen Abfall der Einbauraten bis auf schließlich ca. 20 % der Kontrolle (Tab. 10b).

Auch die insgesamt von der Zelle aufgenommene Aktivität liegt von Anfang an relativ weit unter den Kontrollwerten. Allerdings sieht man nicht den plötzlichen steilen Abfall wie bei den Proteineinbauraten (Tabelle 10 c). Es werden anfangs noch relativ viel markierte Aminosäuren aufgenommen, während deren Einbau in die Proteine bereits stark gehemmt wird (Tabelle 10 d).

Tabelle 10 a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	8.260	10.800	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,18	1,22	103 %
40	1,26	1,37	109 %
60	1,47	1,54	105 %
80	1,29	1,07	83 %
100	1,03	0,56	54 %
120	0,65	0,26	40 %

Tabelle 10 b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in die Proteine

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	10.850	11.330	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,04	0,70	67 %
40	1,01	0,40	40 %
60	1,02	0,33	32 %
80	0,86	0,23	27 %
100	0,99	0,18	18 %
120	0,96	0,20	21 %

Tabelle 10 c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	19.110	22.130	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,10	0,95	86 %
40	1,12	0,87	78 %
60	1,22	0,92	75 %
80	1,05	0,64	61 %
100	1,01	0,37	37 %
120	0,83	0,23	28 %

vgl. Abb. 10, Seite 41

Tabelle 10 d: Proteineinbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
0	56,8 = 100 %	51,2 = 100 %	1,00
20	53,6	37,7	0,78
40	51,4	23,2	0,51
60	47,7	18,5	0,43
80	46,7	18,2	0,44
100	55,6	25,3	0,49
120	66,1	44,9	0,75

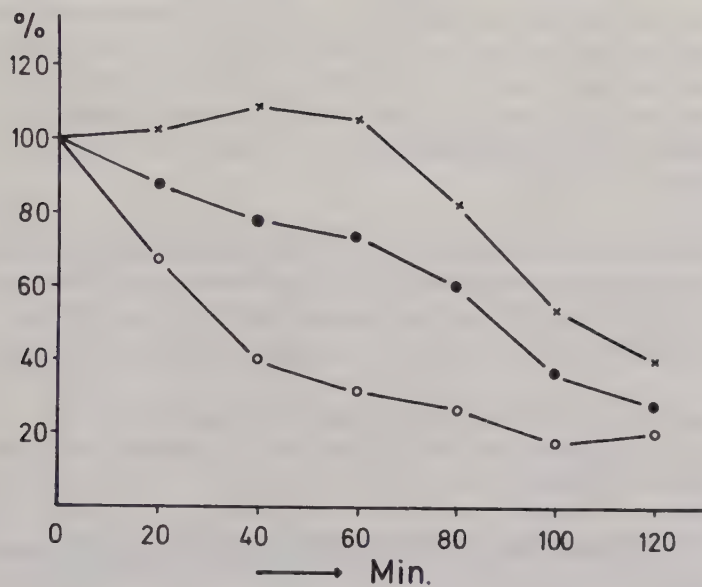


Abb. 10: Der L-(U-¹⁴C)-Leucineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz B
(x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme; o — o : Protein)

c) Der Einfluß auf den Leucineinbau durch N,N-Dimethylhydrazin:

Das Dimethylhydrazin zeigt bis zum Zeitpunkt 40 Minuten keinen sichtbaren Hemmeffekt auf den Leucineinbau in den säurelöslichen Kaltextrakt. Auch im Meßzeitraum bis zu 100 Minuten sinken die Einbauraten nur geringfügig, das Minimum liegt bei 75 %. Erst in den letzten 20 Minuten der Versuchszeit kommt es zu einem bemerkenswerten Abfall der Leucinaufnahme auf 41 % des Kontrollwertes (Tabelle 11 a).

Der Einbau in das Protein ist kaum gehemmt. Ein leichter Effekt macht sich wieder erst nach 40 Minuten bemerkbar. Zum Zeitpunkt 80 Minuten werden noch 81 % und bei Versuchsende 79 % der Kontrolle gemessen (Tabelle 11 b).

Auch die Gesamt-Leucinaufnahme wird kaum beeinflusst; erst zum Zeitpunkt 120 Minuten wird ein deutlicher Hemmeffekt erzielt (Tabelle 11 c).

Entsprechend geringe Abweichungen zeigen die Werte der Tabelle 11 d.

Tabelle 11 a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	5.160	5.860	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,15	1,10	96 %
40	1,05	1,02	97 %
60	1,16	0,92	79 %
80	1,55	1,17	75 %
100	0,97	0,81	84 %
120	1,59	0,65	41 %

Tabelle 11 b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in das Protein

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	12.550	13.270	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,97	1,05	108 %
40	0,82	0,98	119 %
60	1,17	0,99	85 %
80	0,92	0,75	82 %
100	0,86	0,85	99 %
120	1,07	0,84	79 %

Tabelle 11 c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	17,710	19,130	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	1,03	1,06	103 %
40	0,89	0,99	111 %
60	1,16	0,97	84 %
80	1,26	1,00	79 %
100	0,89	0,84	94 %
120	1,23	0,78	63 %

vgl. Abb. 11, Seite 44

Tabelle 11 d: Proteineinbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe :	Probe : Kontrolle
0	70,9 = 100 %	69,4 = 100 %	1,00
20	67,3	68,2	1,05
40	65,5	68,4	1,07
60	71,0	71,0	1,01
80	64,1	64,1	1,02
100	68,3	70,6	1,05
120	62,4	74,4	1,25

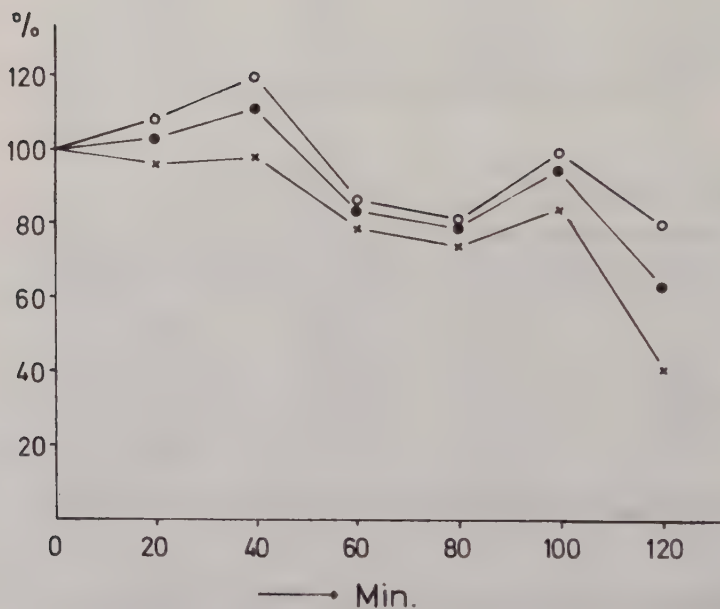


Abb. 11: Der L(U-¹⁴C)-Leucineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. von N,N-Dimethylhydrazin.
(x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme;
o — o : Protein)

d) Der Einfluß auf den Leucineinbau durch Procarbazin:

Auch die Procarbazinwirkung auf die Leucinaufnahme in den säurelöslichen Kaltextrakt setzt zögernd ein. Ein wesentlicher Hemmeffekt wird erst in den letzten 40 Minuten des Versuchszeitraums deutlich. Allerdings fallen dann die Einbauraten auf 48 % der Kontrolle ab (Tabelle 12 a).

Schon frühere Untersuchungen (10) haben gezeigt, daß das Natulan^(R) eine geringe Wirkung auf den Leucineinbau in die Proteine der Ascitestumorzelle ausübt. Die vorliegenden Untersuchungen können dies bestätigen. Die Einbauraten sinken zwar bis zum Zeitpunkt 40 Minuten auf 70 % ab, doch kehren sie schon ab 80 Minuten zur Norm zurück. (Tab. 12 b)

Ebenso verhalten sich die Werte der Gesamtaktivitätsaufnahme. Hier fällt der letzte Wert allerdings ab, was auf den starken Rückgang der Leucinaufnahme in den Kaltextrakt zurückzuführen ist (Tabelle 12 c).

Das Verhältnis von Proteineinbauraten zu Gesamteinbauraten zeigt deutlich, daß die Hemmung der Leucinaufnahme in einer Verminderung des Aktivitätsgehaltes im Kaltextrakt aufgefangen wird und der hochmolekulare Bereich mehr oder weniger unbeeinflusst bleibt (Tabelle 12 d).

Tabelle 12 a: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in den Kaltextrakt

t/min	Kontrolle	Probe	Probe:Kontrolle
	3.540	3.400	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,78	0,74	95 %
40	0,86	0,77	90 %
60	0,75	0,64	85 %
80	1,03	1,01	98 %
100	1,07	0,76	71 %
120	0,88	0,42	48 %

Tabelle 12 b: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Einbauraten in das Protein

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	4.680	4.510	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,99	1,08	109 %
40	1,11	0,78	70 %
60	1,43	1,22	85 %
80	1,25	1,16	93 %
100	1,33	1,40	105 %
120	1,27	1,33	105 %

Tabelle 12 c: L-(U-¹⁴C)-Leucin-Gesamteinbauraten

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
	8.220	7.910	
0	= 1,00	= 1,00	100 %
20	0,90	0,93	103 %
40	1,00	0,78	78 %
60	1,14	0,97	85 %
80	1,15	1,10	96 %
100	1,22	1,13	93 %
120	1,10	0,94	85 %

vgl. Abb. 12, S. 47

Tabelle 12 d: Proteineinbauraten : Gesamtaufnahme

t/min	Kontrolle	Probe	Probe : Kontrolle
0	56,9 = 100 %	57,0 = 100 %	1,00
20	63,0	66,2	1,06
40	62,9	57,4	0,90
60	71,6	71,7	1,00
80	61,4	60,4	0,97
100	62,1	71,0	1,13
120	65,8	80,9	1,22

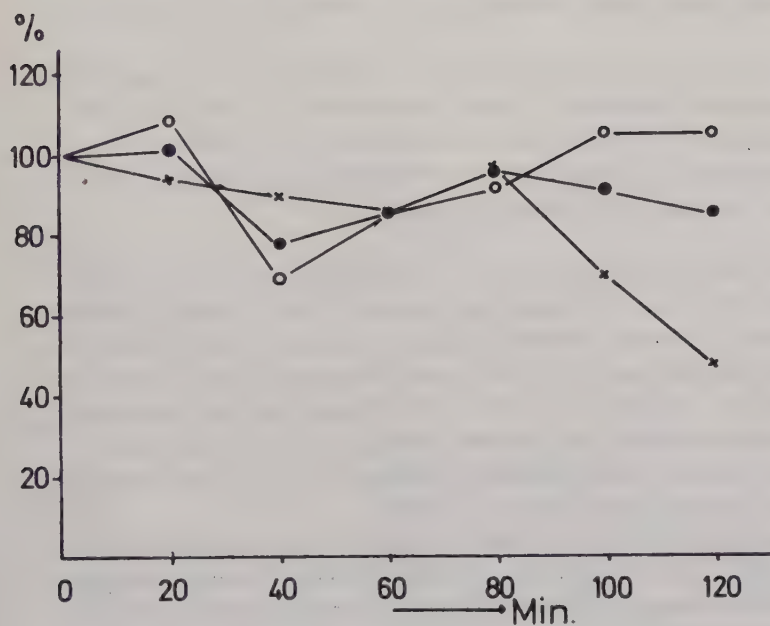


Abb. 12: Der L-(U-¹⁴C)-Leucineinbau unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. Procarbazine (x — x : HClO₄-Extrakt; • — • : Gesamtaufnahme; o — o : Protein)

4. Vergleichende Zusammenfassung über den Einfluß der Substanzen A und B auf den Einbau von Thymidin, Uridin und Leucin in die Ehrlich-Ascitescarcinomzelle

Der Thymidineinbau in die DNS wird von der Substanz A deutlicher als durch Substanz B gehemmt. Der Effekt setzt auch schneller ein.

Der Abfall des Uridineinbaus in die RNS tritt vergleichsweise bei Substanz A etwas verzögert ein; auch sind der Abfall der Einbauraten unter Substanz A zu keinem Meßzeitpunkt so stark und der endgültige Hemmeffekt nicht so groß wie beim Thymidineinbau.

Der Leucineinbau wird durch Substanz A später als der Thymidin- bzw. Uridineinbau gehemmt. Dann kommt es allerdings zu einem starken Abfall der Einbauraten, so daß das Minimum der Leucinaufnahme, ähnlich wie beim Thymidineinbau, schon nach 60 Minuten erreicht ist und sich bis zu Versuchsende auf diesem Niveau hält. Der erreichte Hemmeffekt ist wesentlich schwächer als der beim Thymidin- und Uridineinbau (Abb. 13, S. 49).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Substanz A in vitro in 10^{-3} molarer Konzentration mit über 80 % den Thymidineinbau in die DNS der Ascitestumorzelle sofort und am stärksten hemmt. Die Uridinaufnahme wird auch zu 70 - 80 % gehemmt, doch werden diese Hemmraten erst wesentlich später erzielt. Der Leucineinbau wird mit etwa 50 % Hemmung von der Substanz A am wenigsten beeinflusst. (Abb. 13, S. 49).

Die Substanz B übt im Gegensatz dazu den stärksten Hemmeffekt auf den Uridineinbau in die RNS aus. Die Thymidinaufnahme in die DNS wird zwar gleichfalls sofort erheblich gesenkt, doch liegt der maximale Hemmeffekt von 70 %

vergleichsweise niedrig unter der nahezu 100 %igen Hemmung des Uridineinbaus. Die Leucinaufnahme wird von der Substanz B nach dem Uridineinbau an zweiter Stelle mit einer 80 %igen Hemmung betroffen (Abb. 14, S. 50).

Die Substanz A ist der Substanz B nur in Bezug auf die Aufnahmehemmung von Thymidin überlegen.

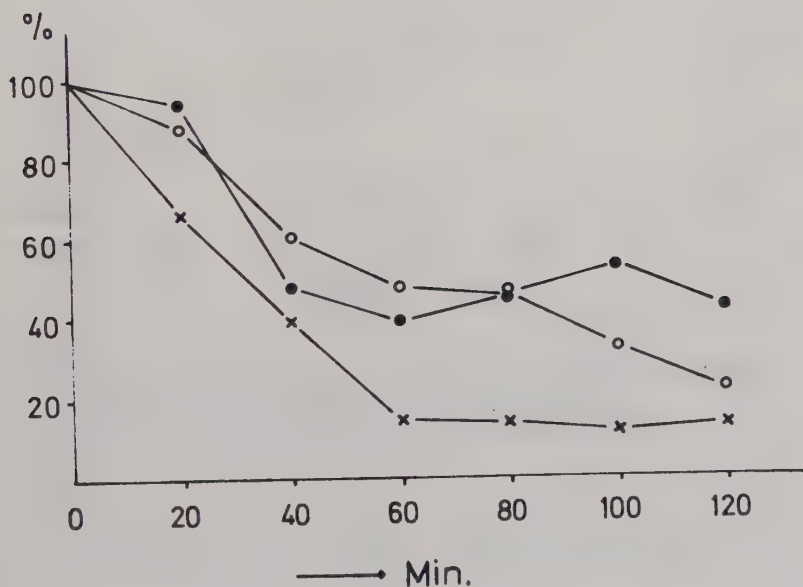


Abb. 13: Die Wirkung von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A auf: Einbau von (6-³H)-Thymidin in DNS (x — x); (6-³H)-Uridin in RNS (o — o) und L-(U-¹⁴C)-Leucin in Protein (· — ·)

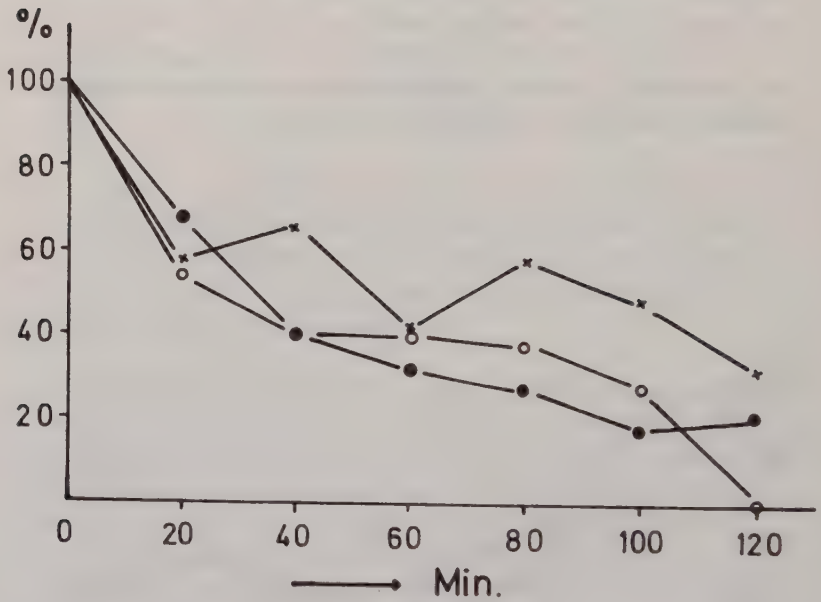


Abb. 14: Die Wirkung von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz B auf:
(6- ^3H)-Thymidineinbau in DNS (x — x);
(6- ^3H)-Uridineinbau in RNS (o — o) und
L-(U- ^{14}C)-Leucineinbau in Protein (• — •)

5. Die Hemmwirkung der Substanzen A und B auf den Thymidin-
Uridin- und Leucineinbau im Vergleich zum N,N-Dimethyl-
hydrazin und Procarbazin

a) Thymidinaufnahmehemmung:

Ein Vergleich der Wirkungen der oben genannten Substanzen auf
den Thymidineinbau in den kalten HClO_4 -Extrakt der Ascitestumorzelle ergibt folgendes Bild: (Abb. 15).

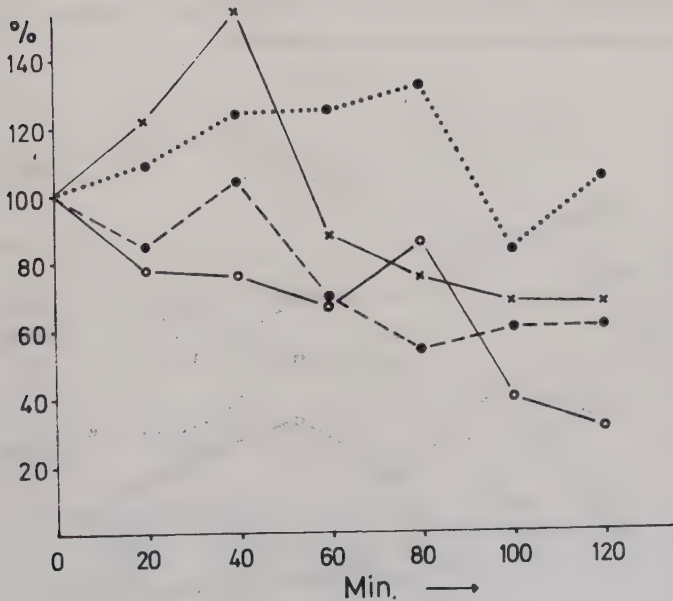


Abb. 15: $(6-^3\text{H})$ -Thymidineinbau in den HClO_4 -Extrakt unter dem
Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A (x — x);
Substanz B (o — o); N,N-Dimethylhydrazin (•.....•)
und Procarbazin (• ---- •).

Die Substanz B zeigt die nachhaltigste Wirkung, die auch zeitlich gesehen den drei Vergleichssubstanzen vorausseilt. Den nächst stärkeren Hemmeffekt zeigt das Natulan^(R), ihm folgt die Substanz A, deren Einfluß zunächst zu Einbauraten weit über den Kontrollwerten führt. Das N,N-Dimethylhydrazin weist nahezu keinen Hemmeffekt auf.

Anders sieht es bei den Thymidineinbauraten in den hochmolekularen Bereich aus (Abb. 16):

Hier zeigt die Substanz A den stärksten Hemmeffekt. Ihr folgt die Substanz B, deren Hemmwirkung ebenfalls sofort einsetzt. Die dritte Stelle nimmt das N,N-Dimethylhydrazin ein, dessen Wirkung aber wesentlich schwächer ist und erst zu einem späteren Zeitpunkt deutlich wird. Das Procarbazin weist nur einen stark verzögerten und geringen Hemmeffekt von kurzer Dauer auf.

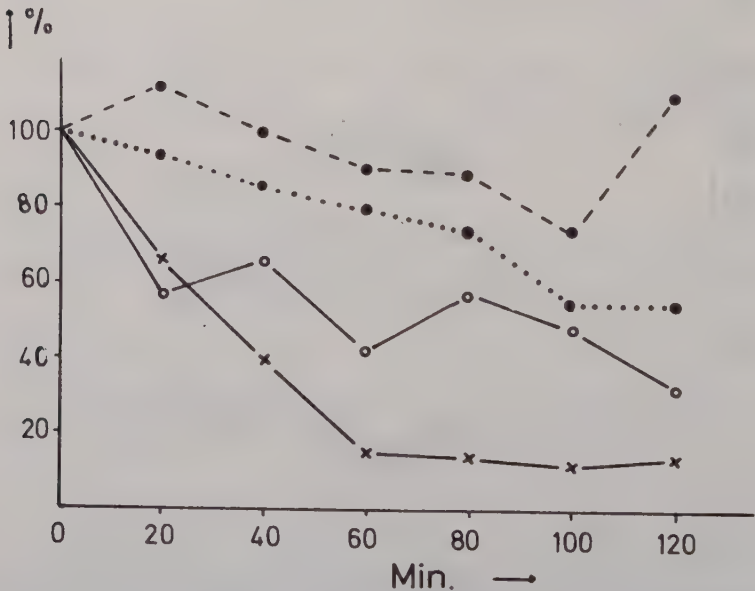


Abb. 16: $(6-^3\text{H})$ -Thymidineinbau in die DNS unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A (x — x), Substanz B (o — o), N,N-Dimethylhydrazin (•.....•) und Procarbazin (o----o).

b) Uridinaufnahmehemmung:

Beim Uridineinbau in den HClO_4 -Kaltextrakt erweist sich wiederum die Wirkung der Substanz B als die stärkste. Sie wird bereits nach 20 Minuten deutlich. An nächster Stelle folgen zusammen das Procarbazin und das N,N-Dimethylhydrazin, deren erst nach einer Stunde einsetzende Hemmwirkung ziemlich gering ist. Die Substanz A bewirkt auch hier wieder einen zeitlich begrenzten Stau an Aktivität, eine Hemmwirkung tritt nicht ein (Abb. 17).

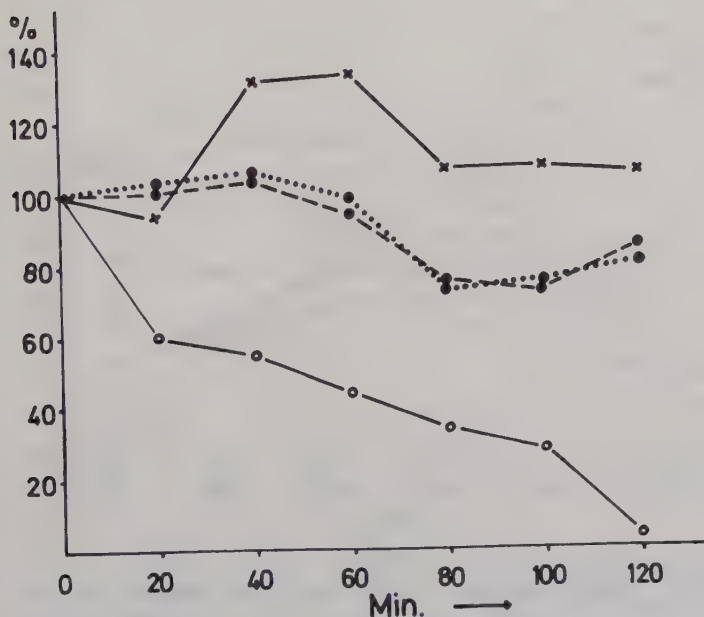


Abb. 17: $(6-^3\text{H})$ -Uridineinbau in den HClO_4 -Extrakt unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A (x — x), Substanz B (o — o), N,N-Dimethylhydrazin (•....•), Procarbazin (s ---- s).

Auch die RNS-Einbauraten werden von der Substanz B am stärksten beeinflusst und bis auf 1 % gesenkt. Die Wirkung setzt wieder schlagartig ein. Als nächst wirksamere Substanzen erweisen sich, sowohl in Bezug auf Stärke als auch Schnelligkeit der Wirkung, die Substanz A, das N,N-Dimethylhydrazin und zuletzt das Procarbazin. Bei den beiden letztgenannten Substanzen ist ein Nachlassen der Wirkung gegen Versuchsende zu erkennen (Abb. 18).

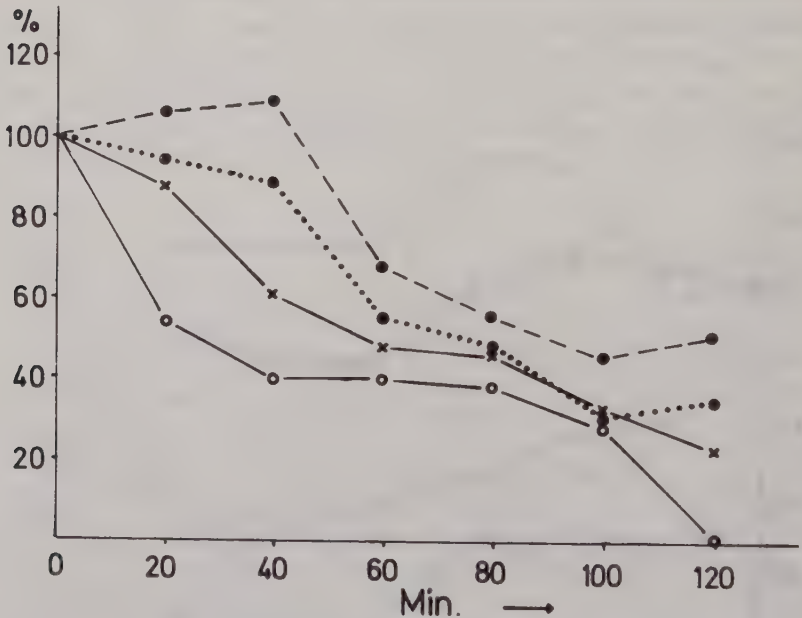


Abb. 18: $(6-^3\text{H})$ -Uridineinbau in die RNS unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A (x — x), Substanz B (o — o), N,N-Dimethylhydrazin (o.....o) und Procarbazin (•----•).

c) Leucinaufnahmehemmung:

Bei der Leucinaufnahme in den kalten Perchlorsäureextrakt läßt eine stärkere Hemmwirkung aller vier Substanzen lange auf sich warten, erst nach etwa 1 Stunde Versuchsdauer zeigen sich beim N,N-Dimethylhydrazin und Procarbazin erste wesentliche Effekte, die bei der Substanz B erst nach 80 Minuten einsetzen. Bei Versuchsende haben Substanz B und N,N-Dimethylhydrazin etwa die gleiche Hemmwirkung. Das Natulan^(R) wirkt etwas schwächer, während Substanz A keine negative Beeinflussung des Leucineinbaus aufweist.

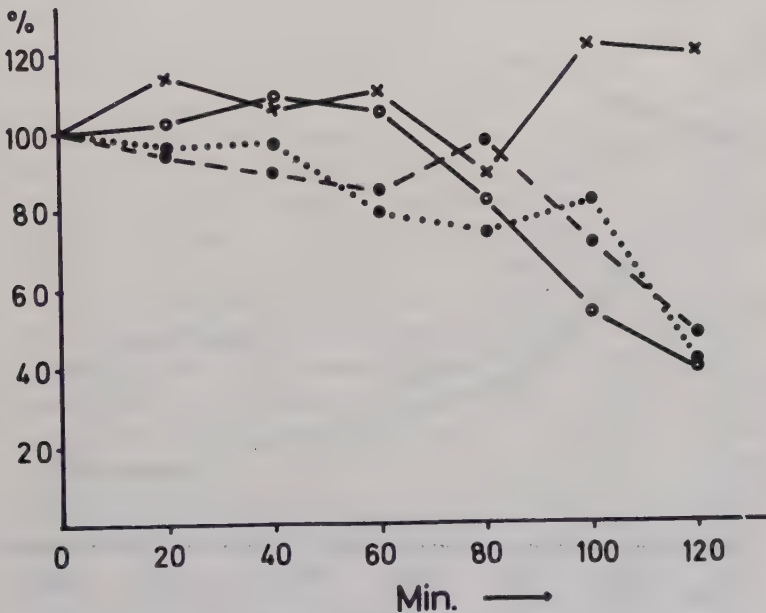


Abb. 19: Der L-(U-¹⁴C)-Leucineinbau in den kalten HClO₄-Extrakt unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (x — x), Substanz B (o — o), N,N-Dimethylhydrazin (•.....•) und Procarbazin (•---•).

Im Gegensatz zu ihrer sehr langsam eintretenden Wirkung auf die Leucinaufnahme in den Kaltextrakt wirkt die Substanz B auf den Einbau in die Proteine schneller als alle anderen verwendeten Substanzen. Auch die Intensität der Wirkung übertrifft die der anderen. Etwa 20 Minuten später setzt dann der hemmende Einfluß der Substanz A und des Procarbazin ein. Während die Substanz A gegen Versuchsende mit ca. 60 % einen ansehnlichen Hemmeffekt erzielt, kehren die Einbauraten unter Procarbazineinfluß bald wieder zur Norm zurück. Das N,N-Dimethylhydrazin zeigt zwar eine geringere und später einsetzende Wirkung als das Natulan^(R), doch bleibt sein Hemmeffekt bis zum Versuchsende erhalten (Abb. 20).

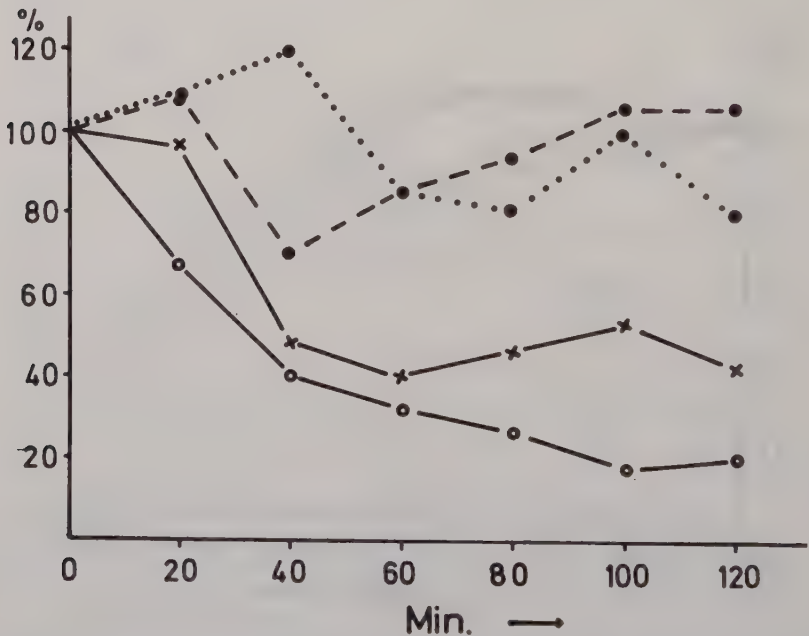


Abb. 20: Der L-(U-¹⁴C)-Leucineinbau in die Proteine unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (x — x), Substanz B (o — o), N,N-Dimethylhydrazin (•...•) und Procarbazin (•---•).

6. Betrachtung des Verhältnisses der eingebauten
Aktivität zur aufgenommenen Gesamtaktivität

Wie oben schon berichtet, treten bei den untersuchten Substanzen starke Unterschiede bezüglich der sich im 'Säurelöslichen' befindenden Aktivität auf, ohne daß sich die Hemmung der Einbauraten in DNS, RNS bzw. Protein entsprechend stark unterscheiden. Dies war Anlaß dazu, das Verhältnis

$$\frac{\text{dpm-Syntheseeinbau}}{\text{dpm-Gesamtaufnahme}} \quad (\text{Qu zum Zeitpunkt } 0 = 100 \%) \text{ zu}$$
berechnen und für die einzelnen Substanzen miteinander zu vergleichen.

a) Untersuchung der DNS-Synthese (Tab. 13 a):

Unter Einwirkung der Substanz A nimmt die Verwendung von aktiven Thymidinbausteinen aus dem Zellpool für die DNS-Synthese sofort stark ab. Da aber noch Thymidin in die Zelle aufgenommen wird, kommt es im Zellpool zu einem Anstau, was zur Steigerung der Aktivitäten über 100 % der Kontrolle und zur Verkleinerung des Quotienten führt (Tab. 1 a). Anders ist die Situation bei der Substanz B. Hier nimmt das untersuchte Verhältnis nur vorübergehend leicht ab, um gegen Versuchsende wieder 100 % zu erreichen. Obwohl die Aktivitätsaufnahme in den Zellpool von Versuchsbeginn an stark gehemmt wird (vgl. Tab. 2 a), kommt es doch zu einer weitgehenden Verwendung der im Kaltextrakt vorhandenen Aktivität zur DNS-Synthese.

Das N,N-Dimethylhydrazin ähnelt in seiner Wirkung der Substanz A, wenn auch alle Effekte schwächer ausgeprägt sind. Das Procarbazin zeigt die geringste Abweichung von der Kontrolle. Unter seinem Einfluß wird zwar die DNS-Synthese leicht gehemmt, aber die im Zellpool gegenüber

der Kontrolle vermindert angebotene Aktivität (Tab.4a) wird eher stärker zur DNS-Synthese herangezogen, wie die Werte für Qu von über 100 % demonstrieren.

Tabelle 13 a: DNS-Einbauraten : Gesamtaufnahme von (6-³H)-Thymidinaktivität.

t/min	Subst.A	Subst.B	N,N-Dimethyl- hydrazin	Pro- carbazin
0	100 %	100 %	100 %	100 %
20	74,8	84,7	92,0	114,4
40	56,2	91,8	85,9	98,4
60	42,1	75,4	90,0	116,7
80	46,7	78,2	68,4	130,4
100	43,8	113,4	76,7	113,4
120	44,7	100,0	65,5	132,2

vgl. Abb. 21

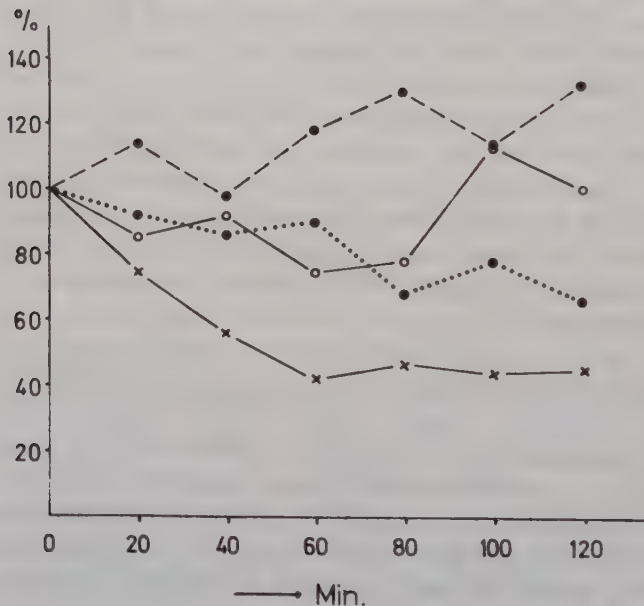


Abb. 21: Quotient der (6-³H)-Thymidinaktivitäten aus DNS-Einbauraten und Gesamtaufnahme unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (x—x), Substanz B (o—o), N,N-Dimethylhydrazin (.....) und Procarbazin (·-·-·-·)

b) Untersuchung der RNS-Synthese (Tab. 13 b):

Hier verhalten sich die Substanzen A und B sowie das N,N-Dimethylhydrazin analog ihrem Einfluß auf die DNS-Synthese. D.h., die beiden freien Hydrazine behindern die RNS-Synthese, während aber noch Aktivität ungehindert in die Zelle aufgenommen wird, was zu einem Anstau im Zellpool führt. Dagegen 'dichtet' das Hydrazon die Zelle ab; die vermindert aufgenommene niedermolekulare Aktivität wird aber normal für die RNS-Synthese verwendet. Das Procarbazin bleibt im ersten Versuchsteil ohne Einfluß auf die RNS-Synthese. Nach einer Stunde wird jedoch sowohl die Aufnahme in den Zellpool (s. Tab. 8 a) als auch die Verwendung der aufgenommenen Aktivität für die RNS-Synthese gehemmt, was sich durch ein Absinken der diskutierten Quotienten bemerkbar macht.

Tabelle 13 b:

t/min	Subst. A	Subst. B	N,N-Dimethyl- hydrazin	Procar- bazin
0	100 %	100 %	100 %	100 %
20	95,7 %	93,2 %	95,0 %	104 %
40	59,8 %	81,7 %	88,0 %	103 %
60	48,5 %	95,3 %	64,0 %	77,4 %
80	54,4 %	94,7 %	73,8 %	78,9 %
100	42,8 %	100,0 %	49,3 %	69,3 %
120	31,1 %	100,0 %	53,2 %	67,2 %

vgl. Abb. 22, S. 60

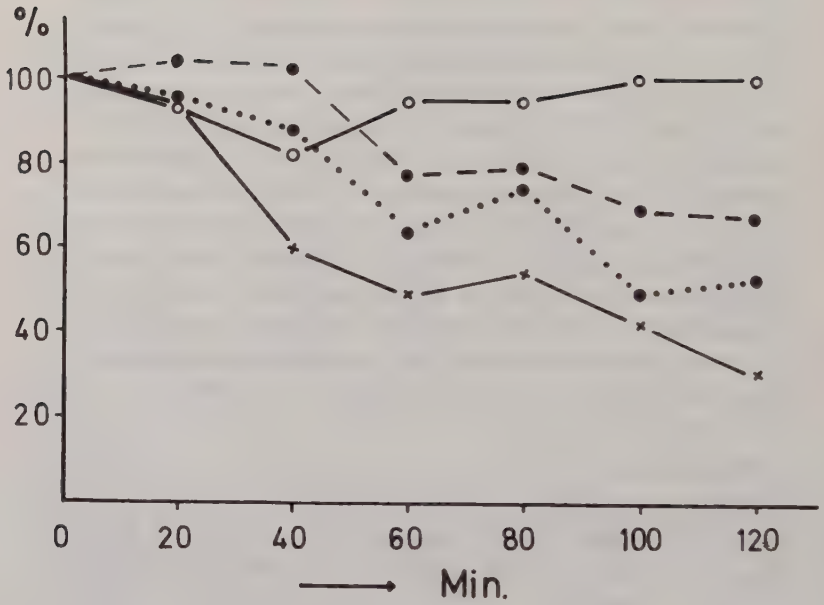


Abb. 22: Quotient der ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uridinaktivität aus RNS-Einbaugraten und Gesamtaufnahme unter dem Einfluß von 10^{-3} Mol/Ltr. der Substanz A (x—x), Substanz B (o—o), N,N-Dimethylhydrazin (•••••) und Procarbazin (•----•)

c) Untersuchung der Proteinsyntheseleistung (Tab. 13c):

Die Substanz A beeinflusst in Art und Stärke die Proteinsynthese wie die DNS- und RNS-Synthese. Dagegen tritt bei der Substanz B die "zellabdichtende" Wirkung gegenüber Leucin erst in der zweiten Versuchshälfte auf. Trotz ausreichenden Leucinangebotes im Zellpool geht jedoch die Proteinsyntheseleistung sehr rasch und stark zurück. Das N,N-Dimethylhydrazin weicht in seinem Einfluß auf die Proteinsynthese ebenfalls von seiner Wirkungsart auf DNS- bzw. RNS-Synthese ab. Es behindert in ähnlicher Weise wie die Substanz B langsam die Aufnahme von Leucin in den Zellpool, bleibt aber im Gegensatz zu ihr auf die Proteinsynthese selbst weitgehend ohne hemmende Wirkung. Es kommt damit in seiner Wirkung nahezu dem Procarbazin gleich, das ebenfalls weder auf die Aufnahme der Aminosäure in Zellen noch auf die Proteinsynthese einen starken Einfluß ausübt.

Tabelle 13 c: Proteineinbauraten : Gesamtaufnahme von L-(U-¹⁴C)-Leucinaktivität

t/min	Subst.A	Subst.B	N,N-Dimethyl- hydrazin	Procar- bazin
0	100 %	100 %	100 %	100 %
20	88,8 %	78,0 %	105 %	106 %
40	57,2 %	51,3 %	107 %	90 %
60	46,4 %	42,7 %	101 %	100 %
80	61,4 %	44,3 %	102 %	97 %
100	54,2 %	48,7 %	105 %	113 %
120	47,8 %	75,0 %	125 %	122 %

vgl. Abb. 23, Seite 62

Bezüglich der DNS- und RNS-Synthese kann also festgestellt werden, daß die Substanz A ihre Wirkung direkt auf die Synthese ausübt, während bei der Substanz B neben einem direkten Einfluß auch noch eine Hemmung

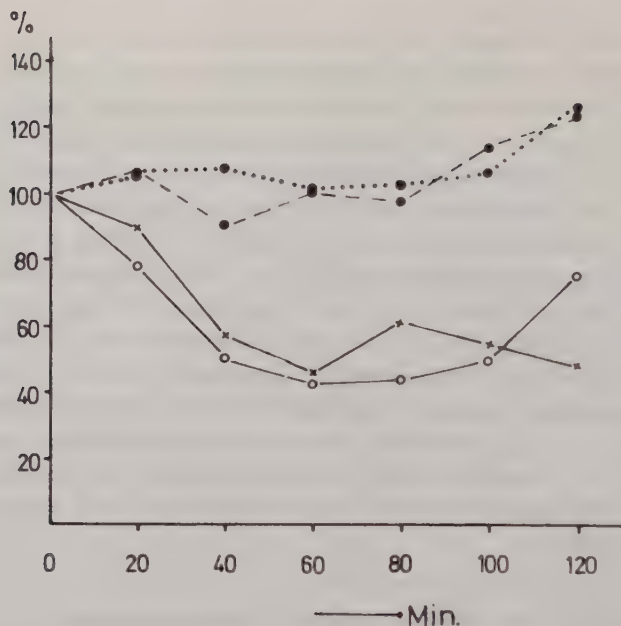


Abb. 23: Quotient der L-(U-¹⁴C)-Leucinaktivität aus Proteineinbauprodukten und Gesamtaufnahme unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (x—x), Substanz B (o—o), N,N-Dimethylhydrazin (•••••) und Procarbazin (·-·-·-·)

der Nukleosidaufnahme in die Zelle hinzukommt. Inwieweit diese Erscheinungen durch Beeinflussung bzw. Veränderung der Zusammensetzung des Zellpools bedingt sein können, soll die im Anschluß beschriebene Untersuchung der säulenchromatographischen Auftrennung des kalten HClO₄-Extraktes zeigen.

C. II. Die säulenchromatographische Trennung des säurelöslichen
HClO₄-Extraktes unter dem Einfluß der vier Substanzen

1. Verteilung von Thymidin auf die Nukleosid-, Mono-, Di-
und Triphosphat-Peaks

Wie schon im methodischen Teil beschrieben wurde, erfolgte die chromatographische Trennung des Kaltextraktes mit Hilfe einer PEI-Cellulose-Säule. Die Identifizierung der trennbaren Bestandteile des Pools, die sogenannten Peaks, erfolgte nach PFLÜGER (18). Nach der Messung des fraktionierten Thymidin-markierten Zellpools bei 260 nm ergeben sich gemäß der Extinktionen folgende Peaks (vgl. Abb. 24, S. 64).

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nukleo- tid	NAD	UDP- Glu- cose	ADP- Glu- cose	UMP TMP	CMP d- CMP	AMP d- AMP	GMP d- GMP	NADP	UDP	CDP
Peak	11	12	13	14	15	16				
Nukleotid	ADP	GDP	UTP d-UTP	CTP ITP	ATP	GTP				

Tab. 14 (zu Abb. 4 und 26): Auftrennung von Hefenukleotiden
an einer PEI-Cellulosesäule nach PFLÜGER (18)

Für die Auswertung der Versuche wurden nur die Basen/Nukleosid- sowie TMP-, TDP-, TTP-Peaks herangezogen. Bei den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich, daß aufgenommenes (6-³H)-Thymidin im Zellpool unbehandelter Ascitestumorzellen während einer zehnminütigen Markierungszeit zum weitaus größten Teil zu Thymidintriphosphat phosphoryliert wird, nämlich zu 79 %. Etwa 15 % befinden sich im TDP, 2 % im TMP und an nicht phosphoryliertem Thymidin finden sich noch ca. 4 % im Basen-Nukleosid-Peak.

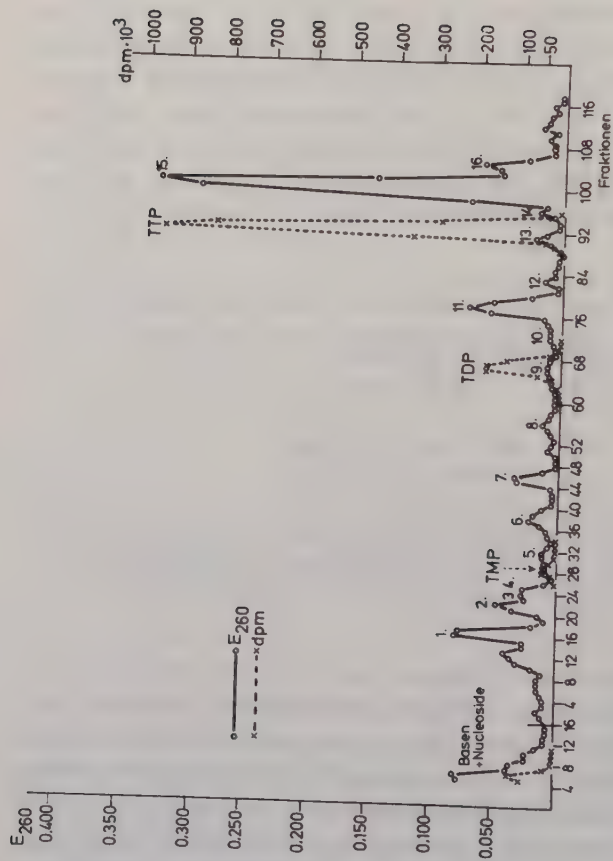


Abb. 24: Auftrennung des säurelöslichen HClO_4 -Extrakts von unbehandelten Ascitistumorzellen an einer PEI-Cellulose-Säule nach Markierung mit $(6\text{-}^3\text{H})$ -Thymidin (OD : $\circ$ - $\circ$; dpm : $\times$ - $\times$)

Tabelle 15 a: Die prozentuale Verteilung der ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymidinaktivität auf Nukleoside, TMP, TDP, TTP

	Basen- Nukleo- side	TMP	TDP	TTP
Kontrolle	4 %	2 %	15 %	79 %
Substanz A	4 %	2 %	29 %	65 %
Substanz B	22 %	14 %	32 %	32 %
N,N-Dimethyl- hydrazin	5 %	3 %	52 %	40 %
Procarbazin	8 %	5 %	29 %	58 %

Tabelle 15 b: Die Thymidinverteilung unter der Einwirkung der vier Substanzen, prozentual mit der Kontrolle verglichen

	Basen- Nukleo- side	TMP	TDP	TTP
Substanz A zu K	100,0 %	100 %	193 %	82 %
Substanz B zu K	550 %	700 %	213 %	41 %
N,N-Dimethyl- hydrazin zu K	125 %	150 %	347 %	51 %
Procarbazin zu K	200 %	250 %	193 %	73 %

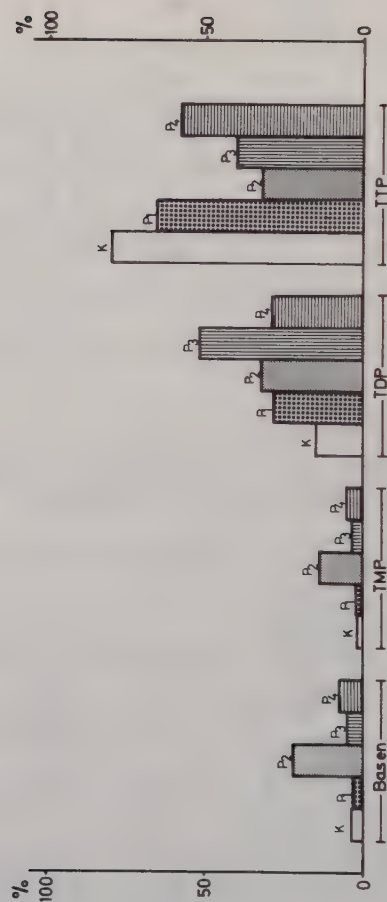


Abb. 25: Der Gehalt an (6-³H)-Thymidin in Nukleosid-, Mono-, Di- und Triphosphatanteilen der löslichen Nukleotide von Asciteszellen unter dem Einfluß von 10⁻³ Mol/Ltr. der Substanz A (P1), Substanz B (P2), N,N-Dimethylhydrazin (P3) und Procarbazin (P4) im Vergleich zur Kontrolle(K).

Vergleicht man diese Verteilung der Aktivität mit den Einbauwerten unter dem Einfluß der Substanz A, so ergeben sich Unterschiede in der Relation der Di- und Triphosphate. Hier liegt ein Verhältnis von 29 % TDP zu 65 % TTP vor. Die Monophosphate und Basen/Nukleoside stimmen anteilmäßig praktisch mit der Normalverteilung im Kontrollansatz überein.

Wesentlich anders verhalten sich die entsprechenden Vergleichszahlen eines mit der Substanz B inkubierten Ansatzes. Hier verbleibt ein sehr großer Teil, nämlich 22 % im Basen-Anteil. Ein beträchtlicher Anteil des Thymidin wird zum TMP aufgebaut - 14 % im Vergleich zu 2 % der Kontrolle. In den Diphosphaten findet man den größten Anteil mit 32 % der Aktivität, d. h. gut doppelt so viel wie bei unbehandelten Zellen. Dagegen beträgt der Anteil des Triphosphates mit knapp 32 % weit weniger als die Hälfte des entsprechenden Kontrollwertes.

Unter dem Einfluß von N,N-Dimethylhydrazin liegt der wesentliche Unterschied in der Verteilung bei den Di- und Triphosphaten. 52 % der Aktivität finden sich hier im TDP und nur 40 % im TTP. Bei Nukleosiden und Monophosphaten sind geringe, aber doch deutliche Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen.

Unter dem Einfluß von Procarbazin verbleiben etwa 8 % des Thymidin im Nukleosid-Peak; im TMP finden sich 5 % und im TDP knapp 29 %. Zum Triphosphat werden 58 % des aufgenommenen Thymidins phosphoryliert.

2. Verteilung von Uridin auf Nukleosid-, Mono-, Di- und Triphosphat-Peaks

Die Abbildung 26 gibt eine Darstellung der gefundenen optischen Peaks mit den dazugehörigen Aktivitätspeaks bei Uridinmarkierung für Nukleoside, UMP, UDP und UTP.

Bei der Markierung mit ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uridin von unbehandelten Ascitestumorzellen über 10 Minuten, wird das Nukleosid zum größten Teil in den Phosphorylierungsprozeß einbezogen. Allerdings wird im Gegensatz zum Thymidin nicht soviel Aktivität in den Triphosphaten gefunden, nämlich nur 46 %. Dementsprechend findet man einen hohen Diphosphatanteil mit 41 % und noch 10,5 % in den Monophosphaten. Im basischen Anteil verbleiben nur ca. 2,5 % der löslichen Aktivität.

Vergleicht man den Kontrollansatz mit den entsprechenden Werten eines mit der Substanz A behandelten Probeansatzes, so liegen die Triphosphate mit ca. 54 % der Gesamtaktivität etwas über der Kontrolle; die Mono- und Diphosphate sind dagegen auf 6 % bzw. 35 % gesenkt. Der Uridinanteil im Basen-Peak liegt mit 5 % der Gesamtaufnahme über dem Kontrollwert.

Eine ganz andere Wirkung zeigt die Substanz B. Hier ist der aktive UTP-Gehalt mit 15 % stark vermindert. Dazu korrespondierend ist der Anteil der Aktivität im Monophosphat-Peak um gut das Dreifache gegenüber der Kontrolle erhöht.

Als Ausdruck einer möglichen initialen Phosphorylierungshemmung übersteigt die im Basenpeak gemessene Aktivität den Kontrollwert mit 16 % um mehr als das Sechsfache. Die Diphosphate erreichen mit 35 % eine der Kontrolle vergleichbare Höhe.

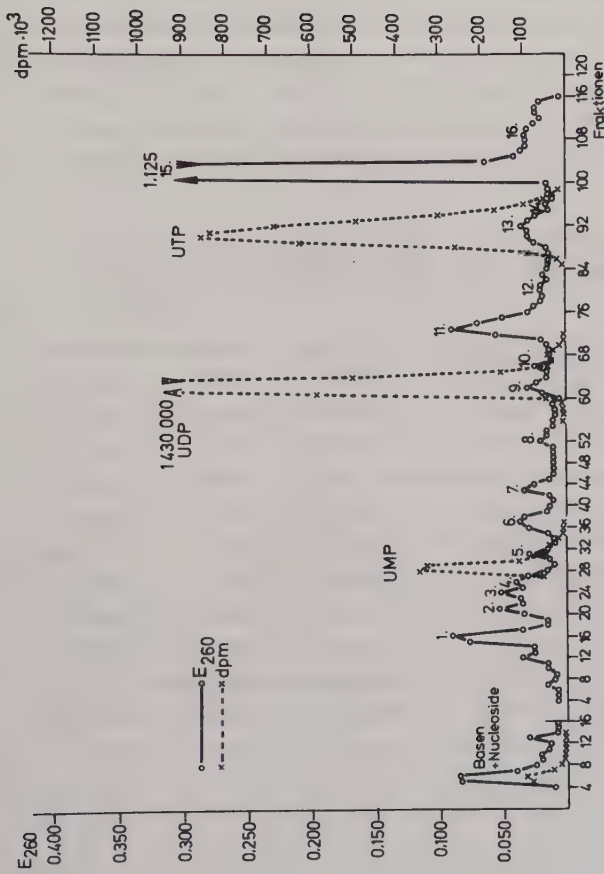


Abb. 26: Auftrennung des säurelöslichen HClO_4 -Extrakts von unbehandelten Ascitistumorzellen an einer PEI-Cellulose-Säule nach Markierung mit $(6\text{-}^3\text{H})$ -Uridin (OD : $\circ$ — $\circ$; dpm : $\times$ — $\times$)

Bei Zusatz von N,N-Dimethylhydrazin zum Versuchsansatz findet man eine wesentlich geringere Beeinträchtigung der einzelnen Phosphorylierungsstufen. Ein leichtes Absinken der Aktivität im UDP und UTP wird entsprechend von einem leichten Anstieg im Basen- und Monophosphat-Peak begleitet. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den mit Procarbazin behandelten Ascitestumorzellen. Die Monophosphate enthalten so viel Aktivität wie die Kontrolle, die Diphosphate etwas weniger Aktivität. Der Uridingehalt im Basen- und Triphosphat-Peak ist etwas gegenüber der Kontrolle erhöht (Tab. 16a, b).

Tab. 16 a: Die prozentuale Verteilung des Uridin auf Nukleoside, UMP, UDP, UTP

	Basen und Nukleoside	UMP	UDP	UTP
Kontrolle	2,5 %	10,5 %	41 %	46 %
Substanz A	5 %	6 %	35 %	54 %
Substanz B	16 %	34 %	35 %	15 %
N,N-Dimethyl- hydrazin	3 %	16 %	38 %	43 %
Procarbazin	4 %	10 %	34 %	52 %

Tabelle 16 b: Die Uridinverteilung unter der Einwirkung der vier Substanzen, prozentual mit der Kontrolle verglichen

	Basen und Nukleoside	UMP	UDP	UTP
Substanz A zu K	200 %	57 %	85 %	117 %
Substanz B zu K	640 %	324 %	85 %	33 %
N,N-Dimethyl- hydrazin zu K	120 %	152 %	93 %	93 %
Procarbazin zu K	160 %	95 %	83 %	113 %

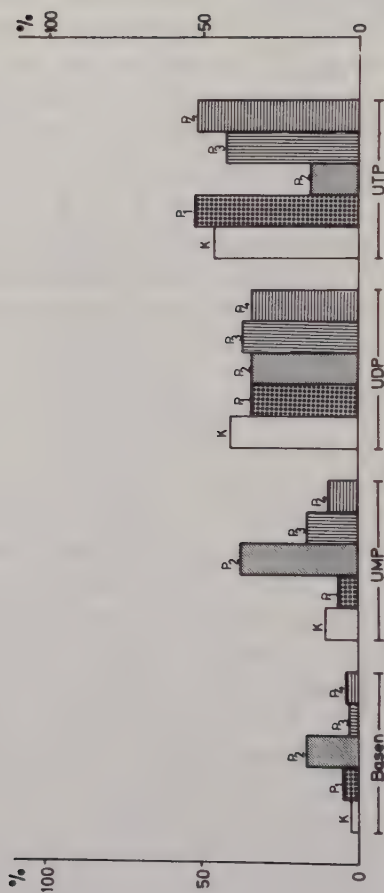


Abb. 27: Der Gehalt an (6-³H)-Uridin in Nukleosid, Mono-, Di- und Triphosphatanteil des löslichen HClO₄-Extraktes von Asciiteszellen unter dem Einfluß von 10-3 Mol/Ltr. Substanz A (P1), Substanz B (P2), N,N-Dimethylhydrazin (P3) und Procarnbazin (P4) im Vergleich zur Kontrolle (K).

D. D I S K U S S I O N

Die eingangs der Arbeit gestellte Frage, ob N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid (Substanz A) und N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon-hydrochlorid (Substanz B) den Einbau von Thymidin, Uridin und Leucin in DNS, RNS und Proteine der Zellen des Ehrlich-Asciteszellcarcinom der Maus hemmen, ist zu bejahen.

Im einzelnen unterscheiden sich die Hemmraten von beiden Substanzen und den zum Vergleich mit herangezogenen Dimethylhydrazinen und Procarbazin zum Teil erheblich in Bezug auf Stärke und Art. So hemmt die Substanz A beim Gesamteinbau am nachhaltigsten den von Thymidin, gefolgt von Uridin- und Leucineinbau. Bei der Substanz B dagegen wird der Uridineinbau am stärksten beeinflusst. Ihr folgen die Thymidin- und Leucineinbauraten. Bis auf die Thymidineinbauhemmung wirkt die Substanz B auch stärker als Substanz A. Von den beiden zum Vergleich herangezogenen Substanzen übertrifft das N,N-Dimethylhydrazin bei der Uridin- und Thymidinaufnahme das Procarbazin. Bei beiden wird, ähnlich der Substanz B, der Uridineinbau mehr betroffen. Die Vergleichssubstanzen erreichten jedoch bei keinem Metaboliten und zu keinem Zeitpunkt die Hemmwirkung der beiden Chloräthylhydrazine.

Durch Auftrennung der aufgenommenen Gesamtaktivität in einen säurelöslichen niedermolekularen und einen hochmolekularen Anteil können differenziertere Aussagen über die Wirkungsart gemacht werden. Auch im hochmolekularen Bereich übt die Substanz A ihre stärkste Wirkung auf die DNS-Synthese aus, gefolgt von RNS- und Proteinsynthese. Diese Reihenfolge gilt sowohl für die Stärke der Hemmung als auch für den Wirkungseintritt. Durch die Umwandlung des N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin in das Benzaldehydhydrazon wird besonders stark die RNS-Synthese betroffen. Auch die Proteinsynthese wird stärker

beeinflusst, während die DNS-Bildung etwas weniger gehemmt wird. Das Hydrazon bringt also nicht nur die erhoffte Verminderung der Toxizität in vivo (s. Einleitung), die von WOLF (23) nachgewiesen werden konnte, sondern auch eine Veränderung im Wirkungsspektrum. Beim N,N-Dimethylhydrazin sind die Effekte deutlich abgeschwächt, und zwar besonders auf die Proteinsynthese. Es wirkt auch schwächer als das von WEITZEL, SCHNEIDER et al. (10) untersuchte einfache Methylhydrazin, übertrifft aber noch die Procarbazinwirkung, die weitgehend mit der von WEITZEL, SCHNEIDER et al. (10) beschriebenen übereinstimmt, vor allem bezüglich der RNS-Synthese.

Interessant sind auch die Aktivitätsunterschiede im Kaltextrakt. Hier fällt auf, daß nur bei Substanz B bei allen drei eingesetzten aktiven Substanzen der Aktivitätsgehalt kontinuierlich von Beginn bis Ende des Versuches abfällt, während bei der Substanz A und dem Dimethylhydrazin die Werte im Bereich der Kontrolle liegen bzw. erst gegen Versuchsende abfallen. Das Procarbazin verhält sich diesbezüglich in der Mitte zwischen Substanz A und B.

Aus den bisher dargestellten Effekten kann geschlossen werden, daß die Substanz A primär und zwar rasch in das DNS-bildende System eingreift. Da gleichzeitig die Aufnahme von Thymidin in die Zellen nicht behindert wird, kommt es zunächst zu einem Aktivitätsstau im Zellpool von über 100 % des Kontrollwertes, der erst mit zunehmender Versuchsdauer abgebaut wird. Ob die RNS-Synthese ebenfalls durch direkten Angriff oder als Folge der DNS-Synthesehemmung gebremst wird, kann auf Grund des schnellen Wirkungseintritts nicht mit Sicherheit gesagt werden. 20 Minuten nach Versuchsbeginn ist die Hemmung allerdings noch geringer als bei der DNS (DNS 66 %, RNS 88 %, Protein 96 % der Kontrolle). Die Hemmung der Proteinsynthese muß

wohl als Sekundäreffekt aufgefaßt werden. WEITZEL, SCHNEIDER et al. (12) konnten zumindest im zellfreien System keine Beeinflussung der Proteinsynthese durch Hydrazine feststellen. Bei der Substanz B wurden sowohl die Syntheseraten als auch die Aufnahme der Substrate in den Zellpool auf den ersten Blick stark gebremst. Die Substanz B zeigt also eine 'zellabdichtende' Eigenschaft, die der Substanz A fehlt. Dieser Effekt tritt, wenn auch weniger ausgeprägt und langsamer eintretend, beim Procarbazin auf, während das Dimethylhydrazin keinen Einfluß auf den Influx der Substrate ausübt.

Betrachtet man das Verhältnis der in den hochmolekularen Bereich eingebauten Aktivität zu der insgesamt in die Zelle aufgenommenen, so stellt man fest, daß dieser Quotient bei Substanz A und auch beim Dimethylhydrazin laufend kleiner wird, d. h. es wird immer weniger von der im Zellpool angebotenen Aktivität verwendet. Beim Dimethylhydrazin trifft dies jedoch nicht für das Leucin zu. Bei Substanz B (DNS, RNS) und Procarbazin (DNS, Protein) weichen die Quotienten nur gering vom Ausgangswert ab, d.h. die Syntheseraten werden durch den Pool gesteuert. Auffallend ist, daß die 'abdichtende' Eigenschaft nach der Substitution an der freien NH_2 -Gruppe des Hydrazin durch einen aromatischen Rest auftritt. WEITZEL, SCHNEIDER et al. (12) schreiben diesen Effekt dem N-Isopropyl-4-formylbenzamid zu, das vermutlich als Metabolit des Procarbazin intermediär auftritt und in der Lage ist, den Eintritt von Nukleosiden in die Ascitestumorzelle zu hemmen.

Bei der Hydrolyse der hier geprüften Substanz B kann aber lediglich Benzaldehyd entstehen, der, wie Vergleichsversuche zeigten, keine Beeinträchtigung der DNS- oder RNS-Synthese bewirkt. Die auftretende Hemmung der Nukleosidaufnahme muß also eine Funktion des intakten 'Hydrazon'

sein. Dies wird wahrscheinlich, wenn man davon ausgeht, daß das Azo-Natulan, das ebenfalls die Nukleosidaufnahme hemmt (12), im tautomeren Gleichgewicht mit der Hydrazoneform des Methylhydrazins steht.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die Zusammensetzung des Kaltextraktes durch den Einfluß der Testsubstanzen verändert wird. Dabei konnte für (6-³H)-Thymidin bei Substanz A festgestellt werden, daß lediglich der Diphosphatanteil zu Ungunsten des Triphosphates erhöht ist. Diese Tatsache allein kann aber nicht die starke DNS-Synthesehemmung erklären, zumal beim Dimethylhydrazin bei weniger starker Synthesehemmung diese Verschiebung noch stärker ausgeprägt ist. Der Angriff der Substanz A muß daher direkt an der DNS bzw. dem Polymerasesystem erfolgen.

Bei der Substanz B findet sich dagegen eine massive Hemmung der Phosphorylierung. So übersteigt der Nukleosidgehalt die Kontrolle um rund 600 % und der Gehalt an aktivem Monophosphat um 700 %. Der Triphosphatgehalt beträgt dagegen nur 40 % der unbehandelten Zellen. Die gleiche Erscheinung, nur in wesentlich abgeschwächter Form, tritt beim Procarbazin auf. Bei der Uridinmarkierung werden für die Substanz B völlig analoge Verschiebungen in gleichen Größenordnungen festgestellt wie bei Thymidinmarkierung. Bei den übrigen drei Verbindungen finden sich zwar auch noch erhöhte Nukleosidwerte, aber die UTP-Konzentration ist eher zu Ungunsten von UMP und UDP leicht erhöht. WEITZEL und SCHNEIDER (12) führen beim Procarbazin die Phosphorylierungshemmung auf die Bildung von Formaldehyd zurück, der nach Oxidation des Natulan^(R) zum Azo-Natulan in einer anschließenden Reaktionskette entstehen kann. Eine solche oxidative Aktivierung ist aber bei der untersuchten Substanz B erschwert. Aus diesem "Hydrazon" läßt sich bei physiologischem pH, selbst unter Verwendung schwacher Oxidationsmittel, kein Formaldehyd abspalten, wie es SCHNEIDER und WEITZEL (24)

beim Natulan^(R) beschreiben. Erst unter harten Bedingungen wie sie PREUSSMANN (25) anwendet, konnten BRAUN und WEBER (26) Formaldehyd in der Siedehitze abspalten. Die Phosphorylierungshemmung über eine Abspaltung von Formaldehyd wie beim Procarbazin ist also schwer vorstellbar. Es muß zumindest, wenn der Aldehyd doch eine Rolle spielen sollte, dieser anders als beim Natulan^(R) aktiviert werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An Ehrlich-Asciteszellen wurden Versuche über den Wirkungsmechanismus von zwei neuen cytostatisch wirksamen Hydrazinderivaten, dem N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-hydrochlorid (Substanz A) und dem N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-benzaldehydhydrazon-hydrochlorid (Substanz B) mit Hilfe von ($6\text{-}^3\text{H}$)-Thymin, ($6\text{-}^3\text{H}$)-Uridin und L-(U- ^{14}C)-Leucin durchgeführt. Über die Wirkung dieser Substanzen auf die Syntheseleistung der Asciteszellen kann gesagt werden:

1. Beide Substanzen hemmen die Synthese von DNS, RNS und Protein, wobei die Substanz A in erster Linie auf die DNS- und die Substanz B auf die RNS-Synthese einwirkt.
2. Während bei der Substanz A die Wirkung im engeren Bereich der DNS-Synthese zu suchen ist, verhindert die Substanz B in starkem Maße die Aufnahme von Nukleosiden in die Zelle.
3. Die Substanz B vermindert die Phosphorylierung von Thymin und Uridin zum Tri-, bzw. Di- und Triphosphat. Bei der Substanz A ist dieser Einfluß geringer.
4. Die Substanz A wirkt auf die Synthese von DNS, RNS und Protein stärker hemmend als das zum Vergleich herangezogene Dimethylhydrazin und das von WEITZEL, SCHNEIDER et al. (10) untersuchte Methylhydrazin. Besonders betroffen ist die DNS-Bildung. Die β -Chloräthylgruppe verstärkt also die Methylhydrazinwirkung allgemein und insbesondere den Einfluß auf die DNS-Synthese.
5. Die Substanz B ist qualitativ in seiner Wirkung dem Procarbazin vergleichbar, vor allem was die Aufnahmehemmung für die Nukleoside in die Zelle und deren Phosphorylierung betrifft. Allerdings sind die Effekte der Substanz B dem Natulan^(R) gegenüber wesentlich verstärkt.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Domagk, G., H.A. Offe, W. Siefken:
Beitr. Klin. Tuberkul. 107, 325 (1952)
2. Fox, H.H., J.T. Gibas:
J. org. Chemistry 18, 983 (1953)
3. Isler, O., H. Gutmann, O. Straub, B. Fust, E. Böhm,
A. Struder:
Helv. chim. Acta 38, 1033 (1955)
4. Pletscher, A., P. Zeller:
Fortschritte der Arzneimittelforschung
Vol. II, Basel-Stuttgart: Birkhäuser
1960, 417
5. Druey, J., B.H. Ringer:
Helv. chim. Acta 34, 195 (1951)
6. Miura, K., K.H. Reckendorf:
The Nitrofurans, in G.P. Ellis, G.B. West:
Progress in Medicinical Chemistry
Bd. 5, 320
7. Zeller, P., H. Gutmann, B. Hegedüs, A. Kaiser,
A. Langemann, M. Müller:
Experientia (Basel) 19, 120 (1963)
8. Bollag, W., E. Grunberg:
Experientia (Basel) 19, 130 (1963)
9. Müller, E.: Med. Inaugural-Diss., Marburg (1960)
10. Weitzel, G., F. Schneider, A.-M. Fretzdorf, J. Durst,
W.D. Hirschmann:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348,
433 (1967)
11. Lingens, F., H. Schneider-Bernlöhrr:
Liebigs Ann. Chem. 686, 134 (1965)
12. Weitzel, G., F. Schneider, W.D. Hirschmann, J. Durst,
R. Thauer, H. Ochs, D. Kummer:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348,
443 (1967)
13. Böhme, H., F. Martin:
Arch. Pharmaz. 307, 272 (1974)

14. Preußmann, R., L. Satzinger, D. Schmähl:
Angew. Chemie 70, 743 (1958)
15. Lange, W.: Med. Inaugural-Diss. Marburg (1975)
in Vorbereitung
16. Schulze, W., G. Letsch:
J. prakt. Chemie 14, 11 (1961)
17. Martin, F., R. Braun:
Unveröffentlichte, persönliche Mit-
teilungen
18. Pflüger, K.H.: Humanbiol. Inaugural-Diss. Marburg
(1975) in Vorbereitung
19. Earle, W.R.: J. Nat. Cancer Inst. 4, 167 (1943)
20. Eagle, H.: Science 122, 501 (1955)
21. Bray, G.A.: Anal. Biochem. 1, 279 (1960)
22. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
23. Wolf, G.: Humanbiol. Inaugural-Diss. Marburg,
in Vorbereitung
24. Weitzel, G., F. Schneider, A.-M. Fretzdorf:
Experientia 20, 38 (1964)
25. Preußmann, R., Hengy, H. und A. v. Hodenberg:
Anal Acta 42, 95 (1968)
26. Weber, K.: Humanbiol. Inaugural-Diss. Marburg,
in Vorbereitung

Lebenslauf

14. Januar 1949 - geboren als 2. Sohn des Zahnarztes
Dr. Fritz Mangold und seiner Ehefrau
Elisabeth, geb. Schütte in Kassel
- 1955 - 1959 - Volksschulbildung in Kassel
- 1959 - 1968 - Gymnasialzeit in Kassel
2. Juli 1968 - Ablegung der Reifeprüfung an der
von Hartung'schen Privatschule, Kassel
- 1968 - 1973 - Studium der Zahnheilkunde an der
Philipps-Universität zu Marburg an der
Lahn
29. Sept. 1969 - Ablegung der naturwissenschaftlichen
Vorprüfung
25. März 1971 - Ablegung der zahnärztlichen Vorprüfung
17. Dez. 1973 - Ablegung der zahnärztlichen Prüfung
24. Jan. 1974 - Approbation als Zahnarzt
- Januar bis
Juni 1974 - Arbeit an der Dissertation
15. Dez. 1972 - Eheschließung mit der Zahnärztin
Ulrike Sacker
- seit Juli 1974 - zahnärztliche Tätigkeit als Sanitäts-
offizier bei der Bundeswehr in
Schwanewede

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Amon, Braun, Castenholz, Dehnicke, Dimroth, Engelhardt,
Frenzel, Goebell, Haan, Hennis, Hering, Heuser, Ihm,
Janke, Karlson, Keil, Koecke, Korb, Kühnel, Niemeyer,
Oehmig, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec,
Schiff, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Seidel, Walcher.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme
des Referates gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Walter Schmid,
der mir als Direktor des Instituts für Pharmakologie und
Toxikologie der Universität Marburg, Lahnberge, auch alle
technischen und finanziellen Mittel zur Verfügung stellte.
Für die wertvollen Anregungen bei der technischen Durch-
führung der Versuche danke ich besonders Herrn Doz.

Dr. Rainer Braun.

Für die technische Hilfeleistung gebührt Frau Speicher mein
besonderer Dank.

